

**THÈSE
POUR LE DIPLOME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 6 septembre 2024
Par Mme Chloë LEMAIRE**

**Développement et validation d'une
qPCR *Trichosporon* spp. et *Rhodotorula* spp.**

Un nouvel outil pour le diagnostic d'infections fongiques invasives rares.

Membres du jury :

Président :

Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, Faculté de Pharmacie de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

Assesseurs :

Madame le Docteur Fanny VUOTTO, Praticien Hospitalier, Service d'infectiologie, Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

Madame le Docteur Marjorie CORNU, Maître de Conférences des Universités et Praticien Hospitalier, Faculté de Médecine de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

Monsieur le Professeur Alexandre ALANIO, Professeur des Universités et Praticien Hospitalier, Université Paris Cité, Hôpital Saint-Louis.

Directeur de thèse :

Monsieur le Docteur Camille CORDIER, Assistant Hospitalier Universitaire, Faculté de Médecine de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

Université de Lille

Président	Régis BORDET
Premier Vice-président	Etienne PEYRAT
Vice-présidente Formation	Corinne ROBACZEWSKI
Vice-président Recherche	Olivier COLOT
Vice-président Ressources humaines	Bertrand DÉCAUDIN
Directrice Générale des Services	Anne-Valérie CHIRIS-FABRE

UFR3S

Doyen	Dominique LACROIX
Premier Vice-Doyen, Vice-Doyen RH, SI et Qualité	Hervé HUBERT
Vice-Doyenne Recherche	Karine FAURE
Vice-Doyen Finances et Patrimoine	Damien CUNY
Vice-Doyen International	Vincent DERAMECOURT
Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires	Sébastien D'HARANCY
Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie	Caroline LANIER
Vice-Doyen Territoire-Partenariats	Thomas MORGENROTH
Vice-Doyen Santé numérique et Communication	Vincent SOBANSKI
Vice-Doyenne Vie de Campus	Anne-Laure BARBOTIN
Vice-Doyen étudiant	Valentin ROUSSEL

Faculté de Pharmacie

Doyen	Delphine ALLORGE
Premier Assesseur et Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement	Anne GARAT
Assesseur à la Vie de la Faculté et Assesseur aux Ressources et Personnels	Emmanuelle LIPKA
Responsable des Services	Cyrille PORTA
Représentant étudiant	Honoré GUISE
Chargé de mission 1er cycle	Philippe GERVOIS
Chargée de mission 2eme cycle	Héloïse HENRY
Chargé de mission Accompagnement et Formation à la Recherche	Nicolas WILLAND
Chargé de mission Relations Internationales	Christophe FURMAN
Chargée de Mission Qualité	Marie-Françoise ODOU
Chargé de mission dossier HCERES	Réjane LESTRELIN

Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BERLARBI	Karim	Physiologie	86
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85

M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
Mme	BOU KARROUM	Nour	Chimie bioinorganique	
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87

Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FRULEUX	Alexandre	Sciences végétales et fongiques	
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	LIBERELLE	Maxime	Biophysique - RMN	
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86

M.	MENETREY	Quentin	Bactériologie - Virologie	
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	ROGEL	Anne	Immunologie	
M.	ROSA	Mickaël	Hématologie	
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mme	KUBIK	Laurence	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	COUSEIN	Etienne	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86

Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BOUDRY	Augustin	Biomathématiques	
Mme	DERAMOUDT	Laure	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
Mme	GILLIOT	Sixtine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
M.	GISH	Alexandr	Toxicologie et Santé publique	
Mme	NEGRIER	Laura	Chimie analytique	

Hospitalo-Universitaire (PHU)

	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DESVAGES	Maximilien	Hématologie	
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	BERNARD	Lucie	Physiologie	
Mme	BARBIER	Emeline	Toxicologie	
Mme	COMPAGNE	Nina	Chimie Organique	
Mme	COULON	Audrey	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
M.	DUFOSSEZ	Robin	Chimie physique	
Mme	KOUAGOU	Yolène	Sciences végétales et fongiques	
M.	MACKIN MOHAMOUR	Synthia	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	NDIAYE-BOIDIN	Maguette	Anglais
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

UFR3S-Pharmacie

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises
dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



Remerciements

À mon président du jury,

Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU,

Professeur des Universités et Praticien Hospitalier,

Faculté de Pharmacie de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

Je vous remercie de me faire l'honneur de juger mon travail et présider le jury de ma thèse. Je tiens également à vous remercier pour votre soutien durant la pandémie COVID-19, pendant laquelle le laboratoire a été si sollicité. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance et de mon profond respect.

À mes assesseurs,

Madame le Docteur Fanny VUOTTO

Praticien Hospitalier - Service d'infectiologie,

Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

Je vous remercie d'avoir si gentiment accepté d'évaluer cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma gratitude et de ma reconnaissance.

Madame le Docteur Marjorie CORNU

Maître de Conférences des Universités et Praticien Hospitalier,

Faculté de Médecine de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

Je te remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Mais avant tout, j'aimerais te remercier pour ton encadrement durant mon stage dans le service. Tu as toujours été disponible pour nous faire partager tes connaissances et ta passion, et ce tout au long de ce stage. Sois assurée de mes plus sincères remerciements.

Monsieur le Professeur Alexandre ALANIO

Professeur des Universités et Praticien Hospitalier,

Université Paris Cité, Hôpital Saint-Louis.

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury. Je vous remercie sincèrement pour tous vos précieux conseils prodigués au cours de ce projet. Je tiens à vous témoigner mon profond respect et ma reconnaissance.

À mon directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Camille CORDIER

Assistant Hospitalier Universitaire,

Faculté de Médecine de Lille, Centre Hospitalier Universitaire de Lille.

Tu m'as fait l'honneur de me proposer ce projet de thèse captivant. Je te remercie pour ta si grande implication dans ce travail, pour ta disponibilité et ton soutien sans faille qui m'ont été d'une aide précieuse. En-dehors de tout cela, je voudrais te remercier pour la gentillesse et l'humanité dont tu fais preuve au quotidien en tant que biologiste. J'espère devenir une biologiste aussi passionnée et passionnante que toi.

Table des matières

TABLE DES TABLEAUX.....	17
TABLE DES FIGURES	19
LISTE DES ABRÉVIATIONS	22
I. Les basidiomycètes : un monde fongique nouveau ?	25
A. Les infections fongiques invasives.....	25
1. Définitions et généralités.....	25
2. Épidémiologie	26
B. Les basidiomycètes en pathologie humaine	29
1. Généralités	29
2. <i>Cryptococcus</i> spp.	32
3. <i>Malassezia</i> spp.	34
C. Les infections à <i>Trichosporon</i> spp. et <i>Rhodotorula</i> spp.	37
1. Généralités	37
2. Infections superficielles.....	39
3. Infections invasives.....	43
D. Diagnostic biologique actuel des infections invasives à <i>Trichosporon</i> spp. et <i>Rhodotorula</i> spp.....	46
1. Prélèvements et examen direct	46
2. Culture	47
3. Marqueurs sérologiques	53
E. Prise en charge : un dialogue clinico-biologique ?.....	55
1. Prise en charge thérapeutique.....	55
2. Interprétation de l'antifongigramme	61
II. La PCR en temps réel : un outil d'avenir pour le diagnostic d'infections fongiques invasives rares ?	63
A. Généralités et principes de la PCR en temps réel TaqMan®	63
1. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)	63

2.	La PCR en temps réel ou qPCR	65
3.	Apport actuel de la PCR dans le diagnostic de rhodotoruloses et trichosporonoses invasives.....	68
B.	Objectifs du travail	69
III.	Matériels et méthodes.....	70
A.	Développement <i>in silico</i> d'amorces et sondes TaqMan®	70
1.	Élaboration des amorces et sondes.....	70
2.	Détermination informatique de la qualité des amorces et sondes.....	76
B.	Extraction de l'ADN d'isolats fongiques	76
1.	Souches fongiques d'intérêt.....	76
2.	Extraction et quantification de l'ADN fongique	78
C.	Amplification de l'ADN fongique.....	79
1.	Mélanges réactionnels	79
2.	Thermocycleur et amplification	81
D.	Évaluation et validation des qPCR.....	82
1.	Efficacité	82
2.	Spécificité analytique	83
3.	Limite de détection/sensibilité analytique.....	84
4.	Répétabilité.....	84
IV.	Résultats.....	85
A.	qPCR sur les régions <i>5,8S</i> et <i>ITS</i>	85
1.	Gamme de concentration d'amorces et sondes.....	85
2.	Efficacité de qPCR – Dépendance du <i>Master Mix</i> , de la température d'hybridation et de la concentration de MgCl ₂ ?	87
3.	Réactions croisées.....	90
B.	qPCR sur les régions <i>28S</i> et <i>IGS</i>	91
1.	Gamme de concentration d'amorces et sondes.....	91
2.	Réactions croisées.....	93

3.	Efficacité de qPCR – Dépendance du <i>Master Mix</i> , et de la température d'hybridation.....	96
4.	Limite de détection : LoD	98
5.	Répétabilité	98
V.	Discussion et perspectives	99
VI.	Conclusion	106
VII.	Références bibliographiques	108
VIII.	ANNEXES.....	118

TABLE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Les différentes espèces de <i>Malassezia</i> , leurs principaux hôtes mammifères, et pathologies associées.	35
Tableau 2 : Classification et composition non exhaustives des genres <i>Trichosporon</i> , <i>Cutaneotrichosporon</i> et <i>Apiotrichum</i>	38
Tableau 3 : Photographies d'isolats de <i>R. mucilaginosa</i> en fonction des milieux de culture.	48
Tableau 4 : Photographies de différentes espèces de levures du genre <i>Trichosporon</i> en fonction des milieux de culture.	49
Tableau 5 : Synthèse des activités <i>in vitro</i> des molécules antifongiques sur les levures du genre <i>Trichosporon</i> et <i>Rhodotorula</i>	61
Tableau 6 : Traitement antifongique systémique recommandé et autres prises en charge chez les adultes atteints d'infections à <i>Trichosporon</i> spp. et <i>Rhodotorula</i> spp. selon l'ECMM/ISHAM	61
Tableau 7 : Valeurs seuils épidémiologiques pour les tests de sensibilité <i>in vitro</i> de <i>T. asahii</i> et <i>R. mucilaginosa</i>	62
Tableau 8 : Séquences génomiques de différentes espèces fongiques utilisées pour la conception des amorces et sondes spécifiques des genres <i>Trichosporon</i> et <i>Rhodotorula</i>	71
Tableau 9 : Cahier des charges suivi pour la conception des amorces et sondes.....	72
Tableau 10 : Séquences des amorces et sondes élaborées sur les régions 5,8S et ITS.....	74
Tableau 11 : Séquences des amorces et sondes élaborées sur les régions 28S et IGS1	75
Tableau 12 : Souches utilisées pour les expériences de réactions croisées de qPCR.	77
Tableau 13 : Caractéristiques des différents milieux réactionnels utilisés.	79
Tableau 14 : Composition du mélange réactionnel	81
Tableau 15 : Programme d'amplification appliqué sur l'automate QuantStudio™ 5	82
Tableau 16 : Liste des abréviations utilisées pour les résultats de réactions croisées	83
Tableau 17 : Résultats des gammes de concentration des différentes amorces	85
Tableau 18 : Résultats d'efficacité des qPCR en fonction du <i>master mix</i> et la température d'hybridation.....	88
Tableau 19 : Efficacité des différents <i>mix</i> en fonction des températures d'hybridation	88
Tableau 20 : Résultats des réactions croisées des <i>mix</i> Tri1 ITS et Tri2 ITS.....	90
Tableau 21 : Résultats des réactions croisées des <i>mix</i> Rho1, 2 et 3 ITS.....	90
Tableau 22 : Résultats des gammes de concentration des différentes amorces	91
Tableau 23 : Résultats des différents tests de réactions croisées de la qPCR Tri1 IGS.	93
Tableau 24 : Résultats des différents tests de réactions croisées de la qPCR Tri2 IGS.	94
Tableau 25 : Résultats des différents tests de réactions croisées de la qPCR T.asa3 IGS. .	94
Tableau 26 : Résultats de l'essai de réactions croisées de la qPCR Rho1 28S.	95
Tableau 27 : Résultats des différents tests de réactions croisées de la qPCR Rho2 28S. ...	95

Tableau 28 : Résultats d'efficacité des qPCR Rho1 28S et Rho2 28S en fonction de la température d'hybridation.....	96
Tableau 29 : Résultats d'efficacité de la qPCR Rho2 28S en fonction de trois <i>master mix</i> différents	97
Tableau 30 : Limite de détection (LoD ₉₅) de la qPCR Rho2 28S.....	98
Tableau 31 : Répétabilité de la qPCR Rho2 28S à deux concentrations différentes.	98

TABLE DES FIGURES

Figure 1 : Critères utilisés pour le diagnostic d'infections fongiques invasives.....	26
Figure 2 : Épidémiologie des principales infections fongiques invasives recensées entre 2012 et 2019 par le réseau RESSIF.....	27
Figure 3 : Épidémiologie des fongémies recensées en France, période 2012-2019	28
Figure 4 : Stades sexué et asexué de <i>Cryptococcus gattii</i>	29
Figure 5 : Arbre phylogénétique des basidiomycètes les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine.....	30
Figure 6 : Mécanisme d'action des principaux antifongiques utilisés en pathologie humaine.....	31
Figure 7 : Observation de la capsule polysaccharidique de <i>Cryptococcus neoformans</i> visualisée à l'aide d'encre de Chine par microscopie optique.....	32
Figure 8 : Classification des cryptocoques d'intérêt médical.....	33
Figure 9 : Aspect de colonies de trois espèces de la famille des <i>Sporidiobolaceae</i> sur gélose PDA (<i>Potato Dextrose Agar</i>).....	38
Figure 10 : Examen au microscope optique de cheveux atteints de piedra.....	40
Figure 11 : Présentation clinique d'une piedra blanche.....	41
Figure 12 : Aspect macroscopique et microscopique de <i>T. inkin</i> en culture.....	42
Figure 13 : Répartition des espèces responsables d'IFI à <i>Trichosporon</i> spp. (et aux nouveaux genres <i>Cutaneotrichosporon</i> et <i>Apiotrichum</i>) rapportées dans la littérature de 1994 à 2015.....	44
Figure 14 : Répartition des espèces responsables de fongémies à <i>Rhodotorula</i> spp. rapportées dans la littérature jusqu'à 2017.....	46
Figure 15 : Éléments morphologiques observés par microscopie optique en fonction des genres fongiques.....	47
Figure 16 : Bases de données utilisées pour l'identification de levures rares.....	50
Figure 17 : Arbre diagnostique des trichosporonoses invasives selon l'ECMM/ISHAM établi en 2021.....	51
Figure 18 : Arbre diagnostique des rhodotoruloses invasives selon l'ECMM/ISHAM établi en 2021.....	52
Figure 19 : Réaction croisée des tests CrAg®-LFA lors d'infection invasive à <i>R. mucilaginosa</i> chez l'animal.....	54
Figure 20 : Recommandations 2021 de l'ECMM en coopération avec l'ISHAM et l'ASM pour le traitement antifongique et la prise en charge des patients atteints d'infections invasives à <i>Trichosporon</i> spp.....	57
Figure 21 : Taux de mortalité associé à <i>T. asahii</i> au cours de différents types d'infections	58

Figure 22 : Recommandations 2021 de l'ECMM en coopération avec l'ISHAM et l'ASM pour le traitement antifongique et la prise en charge des patients atteints d'infections invasives à <i>Rhodotorula</i> spp. (7).....	60
Figure 23 : Les différentes étapes constituant un cycle de PCR	64
Figure 24 : Exemple de courbe de PCR représentant les différentes phases d'amplification (79).....	65
Figure 25 : Principe de la méthode SYBR® Green.	66
Figure 26 : Représentation simplifiée du principe de la sonde TaqMan® (82)	67
Figure 27 : Représentation graphique de l'organisation du gène de l'ARN ribosomique.	70
Figure 28 : Représentation graphique de la formation de structures secondaires (96).....	76
Figure 29 : Représentation des différentes zones de température de la technologie VeriFlex™	81
Figure 30 : Étude de la gamme de concentration d'amorces du <i>mix</i> Tri1 ITS pour l'amplification de <i>T. asahii</i>	86
Figure 31 : Étude de la gamme de concentration d'amorces du <i>mix</i> Tri2 ITS pour l'amplification de <i>T. asahii</i>	86
Figure 32 : Courbe d'amplification de <i>T. asahii</i> pour la qPCR Tri1 ITS en fonction de la concentration de sonde dans le milieu réactionnel (en nM)	87
Figure 33 : Courbes d'amplification de la qPCR Rho2 ITS pour les concentrations en ADN de <i>R. mucilaginosa</i> de 5 ng/μl et 0,5 ng/μl en fonction de la température d'hybridation.	89
Figure 34 : Courbes d'amplification de la qPCR Rho1 ITS en fonction des concentrations croissantes de MgCl ₂ dans le milieu réactionnel.....	89
Figure 35 : Étude de la gamme de concentration d'amorces pour l'amplification de <i>R. mucilaginosa</i> pour la qPCR Rho2 28S.	92
Figure 36 : Courbe d'amplification de l'ADN de <i>R. mucilaginosa</i> par la qPCR Rho2 28S en fonction de la concentration de sonde dans le mélange réactionnel.	93
Figure 37 : Courbes d'amplification observées lors de l'essai n°2 de réaction croisée du <i>mix</i> Rho2 28S.	96
Figure 38 : Courbes d'amplification observées lors de l'essai n°5 de réaction croisée du <i>mix</i> Rho2 28S en fonction de la température d'hybridation.	96
Figure 39 : Courbes d'amplifications et droites standards de la qPCR Rho2 28S en fonction de différents <i>master mix</i>	97

TABLE DES ANNEXES

ANNEXE 1 : Alignement des séquences 5,8S et ITS pour la conception des qPCR Tri1-2 ITS et Rho1-2-3 ITS.....	118
ANNEXE 2 : Alignement des séquences 28S pour la conception des qPCR Rho1 et Rho2 28S.....	119
ANNEXE 3 : Alignement des séquences IGS pour la conception des qPCR Tri1 et Tri2 IGS et T.asa3.....	120
ANNEXE 4 : Tableau résumant les caractéristiques <i>in silico</i> des amorces et sondes développées sur les régions 5,8S et ITS.....	121
ANNEXE 5 : Tableau résumant les caractéristiques <i>in silico</i> des amorces et sondes développées sur les régions 28S et IGS.....	122
ANNEXE 6 : LoD ₉₅ de la qPCR Rho2 28S.....	123
ANNEXE 7 : Recherche de spécificité <i>in silico</i> sur le logiciel <i>Primer-BLAST</i>	124
ANNEXE 8 : Photographie de la souche <i>T. asahii</i> n°1 contaminée par <i>R. mucilaginosa</i> sur gélose Sabouraud.....	124

LISTE DES ABRÉVIATIONS

(A)	Adénine
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomique
ARN	Acide ribonucléique
ASM	<i>American Society for Microbiology</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BDGs	β -(1,3)-D-glucanes
BHQ	<i>Black Hole Quencher</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tools</i>
(C)	Cytosine
CBP	<i>Clinical breakpoint</i>
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CLSI	<i>Global Laboratory Standards for a Healthier World</i>
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNRMA	Centre National de Référence des Mycoses invasives et Antifongiques
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
Ct	<i>Cycle threshold</i>
Cq	<i>Quantification cycle</i>
CV	Coefficient de variation
CVC	Cathéter veineux central
dNTP	Désoxyribonucléoside triphosphate
dTTP	Désoxythymidine triphosphate
dUTP	Déoxyuridine triphosphate
ECMM	<i>European Confederation of Medical Mycology</i>
ECV	<i>Epidemiological cutoff value</i>
EEQ	Évaluation Externe de la Qualité
EORTC	<i>European Organization for Research and Treatment of Cancer</i>
ESCMID	<i>European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease</i>

FRET	<i>Fluorescence Resonance Energy Transfer</i>
(G)	Guanine
GXM	Glucurono-xylo-mannane
IFI	Infection fongique invasive
IGS	<i>Intergenic spacer</i>
ISHAM	<i>International Society for Human and Animal Mycology</i>
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
LAT	<i>Latex Agglutination Test</i>
LBA	Lavage broncho-alvéolaire
LCS	Liquide cérébro-spinal
LFA	<i>Lateral Flow Assay</i>
LoD	<i>Limit of Detection</i>
MALDI-ToF	<i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight</i>
Mg ²⁺	Ion magnésium
MGB	<i>Minor groove binder</i>
MgCl ₂	Chlorure de magnésium
MSGERC	<i>Mycoses Study Group Education and Research Consortium</i>
NFQ	<i>Non-fluorescent quencher</i>
NTC	<i>No Template Control</i>
pb	Paire de bases
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PDA	<i>Potato Dextrose Agar</i>
qPCR	<i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RESSIF	RESeau de Surveillance des Infections Fongiques
SIDA	Syndrome d'immunodéficience acquise
SNC	Système nerveux central
(T)	Thymine
(U)	Uracile
UNG	Uracile-ADN glycosylase
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine

I. Les basidiomycètes : un monde fongique nouveau ?

A. Les infections fongiques invasives

1. Définitions et généralités

Les infections fongiques, ou mycoses, sont des infections causées par des champignons de type micromycètes. Elles sont dites invasives lorsque le champignon est présent dans le sang, les tissus ou les organes. Les infections fongiques invasives (IFI) sont causées par différents agents fongiques. Les plus couramment impliqués en pathologie humaine sont les levures tels que les genres *Candida* et *Cryptococcus*, les moisissures tels qu'*Aspergillus* spp. ou les Mucorales, et également *Pneumocystis jirovecii*.

Les critères diagnostiques des IFI ont été révisés en 2020 par l'association de deux sociétés savantes : l'*European Organization for Research and Treatment of Cancer* et le *Mycoses Study Group Education and Research Consortium* (EORTC/MSGERC) (1).

Il existe trois catégorisations d'IFI, elles peuvent être : prouvées, probables ou possibles. Les IFI prouvées reposent sur la mise en évidence d'un champignon par l'examen direct ou la culture d'un échantillon provenant d'un site stérile. À ce jour, les techniques de biologie moléculaire ne permettent pas à elles seules de classer une IFI comme prouvée. Dans le cadre des IFI prouvées par un examen direct positif, la PCR (*Polymerase Chain Reaction*) combinée au séquençage peuvent néanmoins permettre l'identification du genre ou de l'espèce de l'agent fongique observé.

Une IFI est classée comme « probable » par la présence de critères microbiologiques, en association avec la présence de facteurs prédisposant de l'hôte et de critères clinico-radiologiques spécifiques de chaque spectre d'infection fongique. En l'absence d'arguments microbiologiques, une IFI est classée comme « possible » (Figure 1).

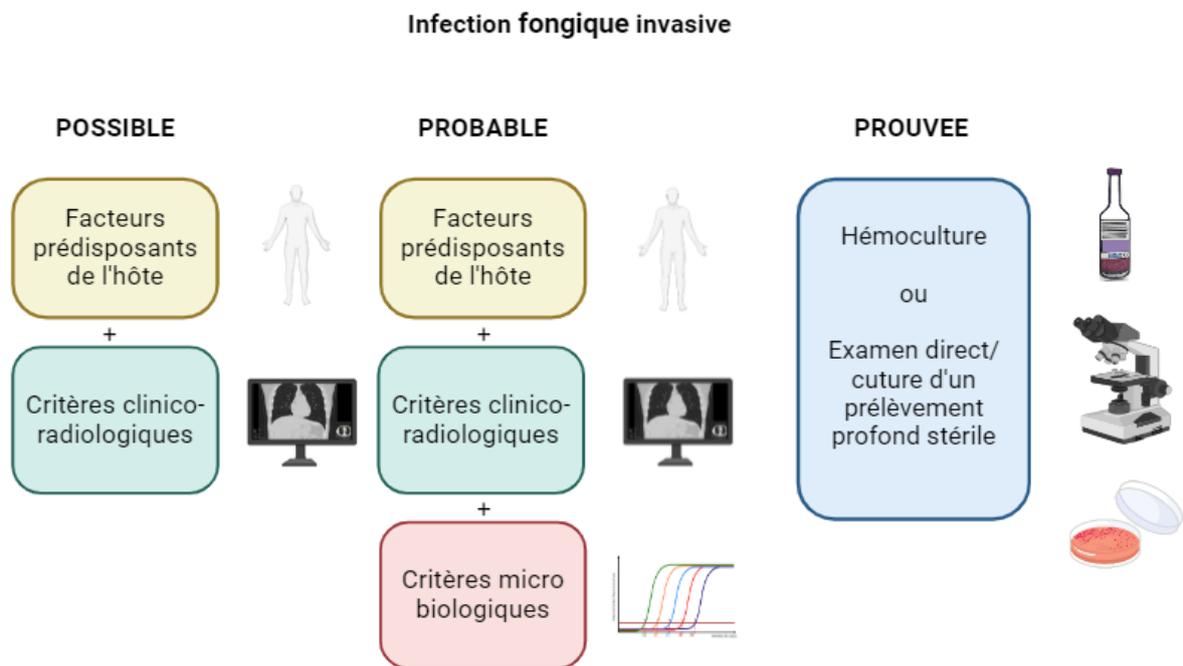


Figure 1 : Critères utilisés pour le diagnostic d'infections fongiques invasives

Adapté (BioRender, Chloë LEMAIRE) des recommandations des sociétés expertes de l'EORTC/MSGERC.

La biologie moléculaire, telle que la PCR, n'était pas une méthode reconnue comme critère microbiologique dans la version 2008 des recommandations de l'EORTC/MSGERC du fait d'un manque de standardisation et de validation clinique (2). La révision de la classification réalisée en 2020 marque l'ajout de la biologie moléculaire aux critères microbiologiques. Les outils intégrés à ces critères sont : la qPCR (*quantitative Polymerase Chain Reaction*) *P. jirovecii* sur prélèvements respiratoires, la qPCR *Aspergillus fumigatus* sur sérum, plasma et lavage broncho-alvéolaire (LBA), et la détection de l'ADN (acide désoxyribonucléique) de *Candida* par résonance magnétique (T2Candida®).

2. Épidémiologie

Du fait de l'augmentation de l'espérance de vie et de l'utilisation de thérapeutiques immunosuppressives, l'incidence des IFI est en constante augmentation depuis plusieurs années.

En 2024, David W. Denning estime qu'il y a environ 6,55 millions de cas d'infections fongiques sévères chaque année dans le monde, qui entraînent 3,75 millions de décès (3). Parmi ces décès, 68 % sont directement liés à une infection fongique. Ces chiffres sont toutefois à nuancer du fait de l'hétérogénéité des études

réalisées. L'Organisation Mondiale de la Santé a publié en 2022 un rapport présentant une liste des agents pathogènes fongiques prioritaires. Ce rapport propose notamment des stratégies de renforcement de la surveillance mondiale des infections fongiques au sein des laboratoires. Cette surveillance est encore considérée comme insuffisante, et responsable d'un manque de données épidémiologiques (4).

En France, selon les données du RESeau de Surveillance des Infections Fongiques (RESSIF), 12 353 IFI ont été notifiées entre 2012 et 2019. Les principales mycoses invasives recensées au cours de cette période étaient les fongémies, qui, à elles seules, représentaient la moitié des IFI déclarées (5) (Figure 2).

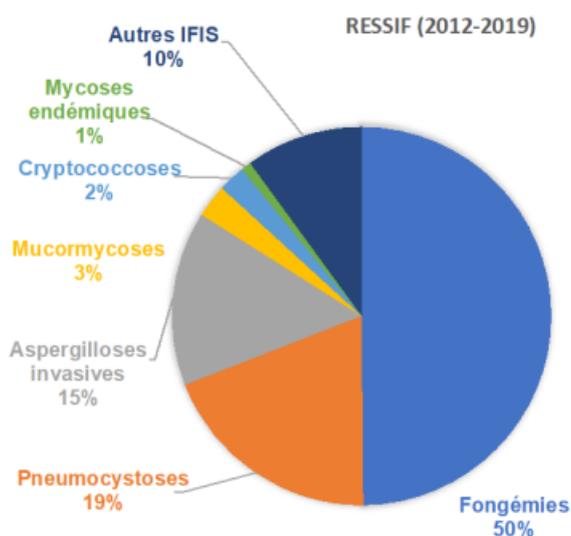


Figure 2 : Épidémiologie des principales infections fongiques invasives recensées entre 2012 et 2019 par le réseau RESSIF.

Diagramme issu du rapport d'activité du CNRMA 2020 portant sur l'année 2019. (5)

Au sein des fongémies, le Centre National de Référence des Mycoses invasives et Antifongiques (CNRMA) précise que parmi les 6 378 hémocultures positives, 6 283 d'entre-elles l'étaient à levures. Les levures du genre *Candida* étaient les plus fréquemment isolées, représentant environ 97 % des cas, avec *Candida albicans* comme espèce la plus fréquente (50,5 %). Parmi les levures identifiées, 2,9 % étaient des basidiomycètes dont 107 du complexe *Cryptococcus neoformans* (*Cryptococcus neoformans* et *Cryptococcus deneoformans*), 35 *Rhodotorula mucilaginosa*, 27 *Trichosporon* spp. et 13 *Malassezia* spp. (5) (Figure 3).

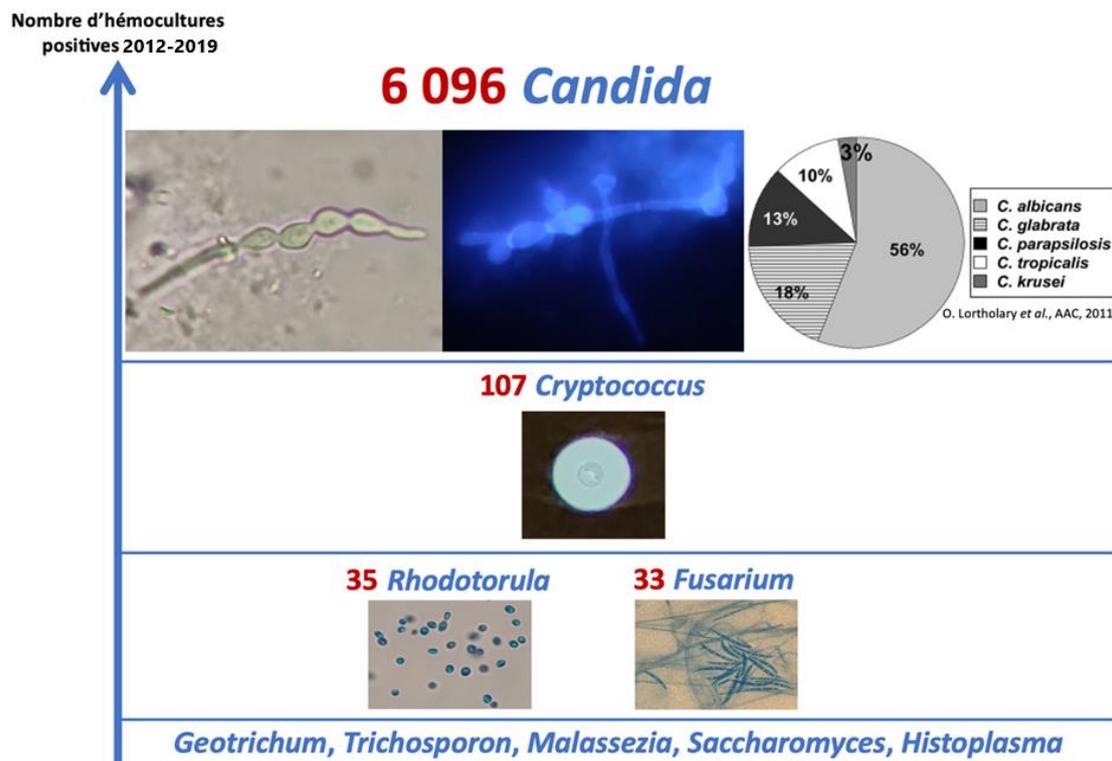


Figure 3 : Épidémiologie des fongémies recensées en France, période 2012-2019

Adapté du rapport d'activité du CNRMA 2020 (Dr Camille CORDIER) (5).

Cette épidémiologie des IFI permet de diviser les levures en 2 catégories.

Les levures dites « communes », principaux agents d'IFI. Classiquement, les levures désignées dans cette catégorie sont : *C. albicans*, *Candida glabrata* (syn. *Nakaseomyces glabrata*), le complexe *Candida parapsilosis* (incluant *Candida parapsilosis sensu stricto*, *Candida orthopsilosis* et *Candida metapsilosis*), *Candida tropicalis*, *Candida krusei* (syn. *Pichia kudriavzevii*) et le complexe *Cryptococcus* spp. Les levures communes sont distinguées des autres levures, catégorisées comme levures « peu communes », ou également « rares » (6).

Une liste de levures rares a été établie par l'*European Confederation of Medical Mycology* (ECMM) en coopération avec l'*International Society for Human and Animal Mycology* (ISHAM) et l'*American Society for Microbiology* (ASM), regroupant les levures rencontrées en pathologie humaine qui n'appartiennent ni au genre *Candida*, ni au genre *Cryptococcus*. Les auteurs précisent néanmoins la non-exhaustivité de cette classification (7). Il est important de relever que la terminologie de levures « rares » souligne uniquement la faible incidence de ces levures dans les infections invasives humaines. À l'inverse, ces levures sont fréquemment retrouvées dans l'environnement ou comme colonisant chez l'homme.

Les levures du genre *Rhodotorula* et *Trichosporon* font notamment parties du groupe de levures rares. Il a été observé durant ces deux dernières décennies une augmentation de l'incidence des infections invasives à levures rares, les espèces incriminées étant relativement différentes selon la zone géographique (8).

B. Les basidiomycètes en pathologie humaine

1. Généralités

Les basidiomycètes ou *Basidiomycota* constituent un vaste embranchement (ou *phylum*) qui contient la plupart des macrochampignons décrits en mycologie non médicale.

Cet embranchement se distingue notamment par la présence de basidiospores, spores issues d'une reproduction de type sexué, généralement regroupées par tétrades à l'extrémité de cellules fertiles : les basides (9) (Figure 4).

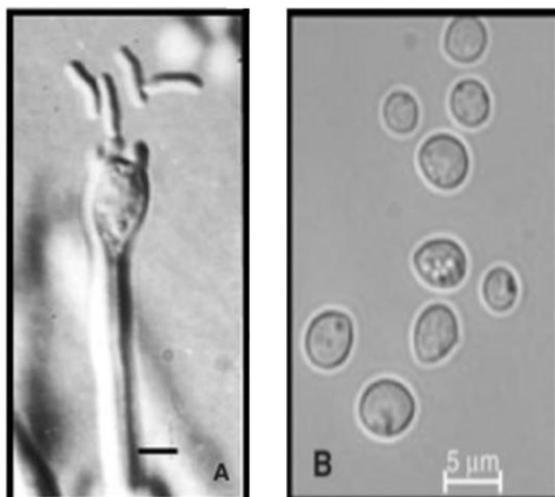


Figure 4 : Stades sexué et asexué de *Cryptococcus gattii*

(A) basides et basidiospores, (B) levures globuleuses à ovales (9).

Très présents dans l'environnement, les basidiomycètes d'intérêt médical sont en nombre restreint. On peut distinguer quatre genres plus fréquemment retrouvés en pathologie humaine : *Cryptococcus* spp., *Malassezia* spp., *Rhodotorula* spp., et *Trichosporon* spp. (10) (Figure 5).

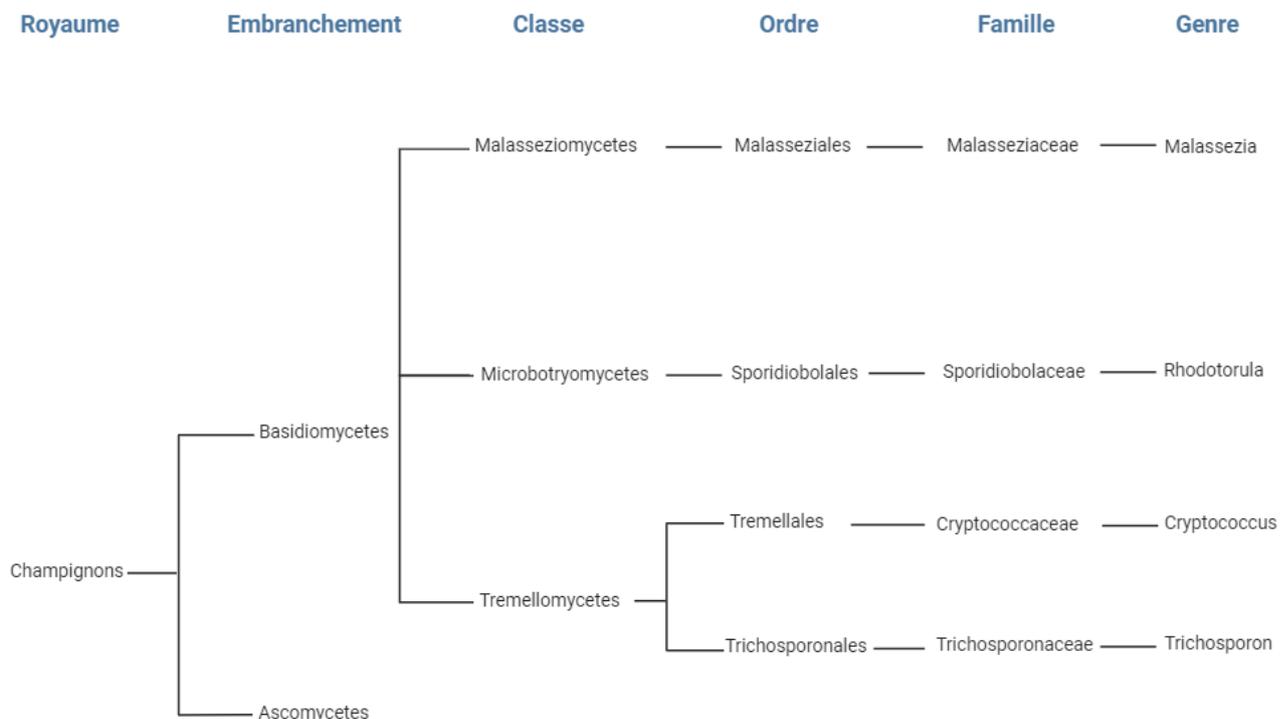


Figure 5 : Arbre phylogénétique des basidiomycètes les plus fréquemment rencontrés en pathologie humaine.

(BioRender, Chloë LEMAIRE) d'après *Taxonomy National Library of Medicine*.

Ces levures basidiomycètes sont naturellement résistantes aux échinocandines.

L'utilisation thérapeutique de cette classe d'antifongique remonte aux années 2000 avec la mise sur le marché progressive de la caspofungine, la micafungine, l'anidulafungine, et plus récemment de la rézafungine.

Les échinocandines sont des lipopeptides inhibiteurs de la synthèse de la paroi fongique, entraînant ainsi une lyse cellulaire. Plus précisément, elles ciblent spécifiquement la β -1,3-glucane synthase (enzyme codée par le gène *FKS*), et inhibent de manière non compétitive la synthèse du β -1,3-D-glucane (BDG), élément essentiel de la paroi fongique de la plupart des champignons (11) (Figure 6).

Le mécanisme de résistance aux échinocandines des basidiomycètes n'est pas totalement élucidé. Il semblerait que chez *C. neoformans*, la β -1,3-glucane synthase soit sensible à l'inhibition par les échinocandines. Le mécanisme de résistance ne serait donc pas lié à une mutation de cette cible thérapeutique (11) (12). Une des hypothèses suggère que la paroi cellulaire des basidiomycètes pourrait contenir moins de BDG, mais au contraire davantage de chitine ou de β -(1,6)-D-glucane (13). La seconde hypothèse, qui a été découverte chez *C. neoformans*, repose sur un mécanisme de régulation intracellulaire de l'homéostasie calcique. Ce mécanisme

entraînerait une régulation la signalisation calcium/calcineurine qui est normalement hyperactivée lorsque la levure est exposée à la caspofungine (14).

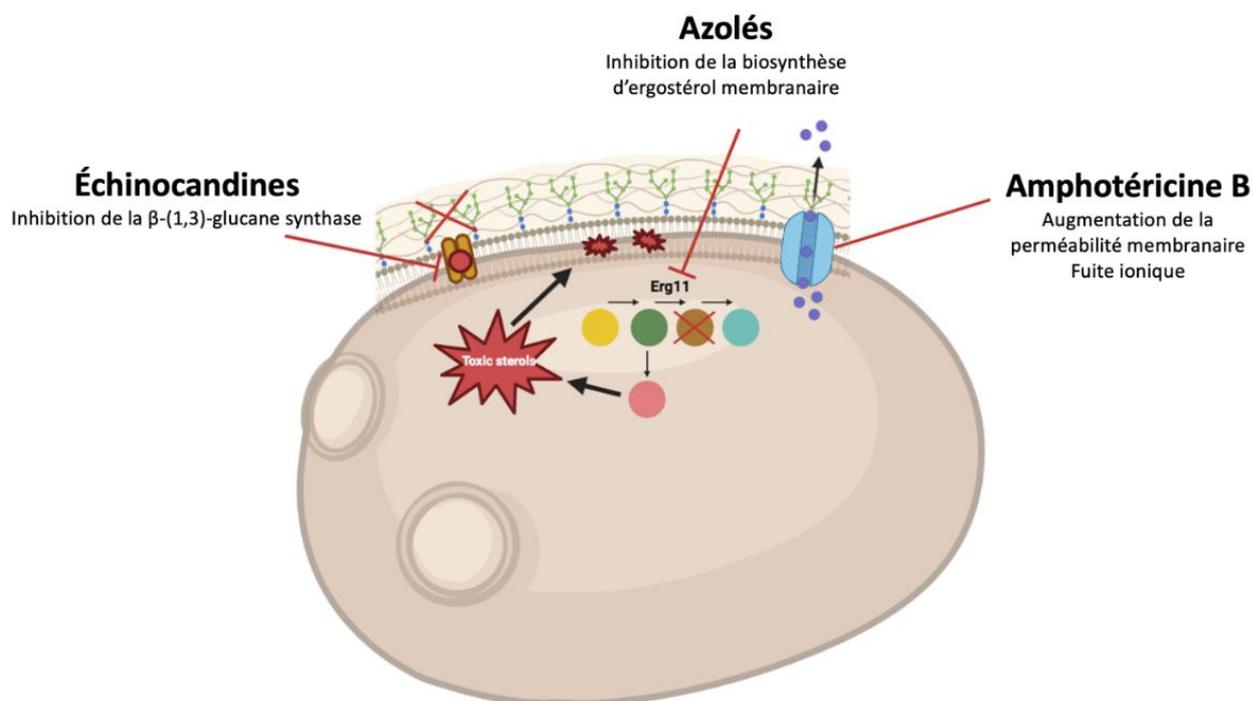


Figure 6 : Mécanisme d'action des principaux antifongiques utilisés en pathologie humaine.

Adapté (BioRender, Dr Camille CORDIER) de S E. Murphy & T. Bicanic, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2021.

La résistance naturelle des basidiomycètes aux échinocandines pose problème dans le traitement précoce des fongémies.

Selon les recommandations de 2012 de l'*European Society of Clinical Microbiology and Infectious Disease* (ESCMID), un traitement antifongique empirique par fluconazole ou échinocandine doit être envisagé chez les patients fébriles en unité de soins intensifs, en l'absence d'étiologie microbiologique identifiée (15).

Chez les patients susceptibles d'être neutropéniques pendant plus de 10 jours, l'ESCMID recommande l'administration d'échinocandines ou d'amphotéricine B liposomale en cas d'IFI présumée ; c'est-à-dire chez les patients présentant une fièvre persistante et résistante à une antibiothérapie à large spectre depuis plus de 3 à 4 jours (16).

Enfin, un épisode de fongémie prouvée doit être traité en première intention par une molécule de la classe des échinocandines (15). Comme l'a démontré le CNRMA, la majorité des fongémies à levures sont des candidémies (5). La majeure partie des

espèces impliquées dans les candidémies sont sensibles aux échinocandines, justifiant leur utilisation en première intention. L'examen direct réalisé à partir d'un flacon d'hémoculture ne permet pas d'identifier le genre auquel appartient la levure observée, il est nécessaire d'attendre le résultat de la culture (24 à 48 heures) afin d'obtenir une identification du genre fongique. Ainsi, en cas de fongémie à *Trichosporon* spp. ou *Rhodotorula* spp., il faudra attendre le résultat de la culture afin de pouvoir traiter avec un traitement antifongique efficace.

2. *Cryptococcus* spp.

Les espèces du genre *Cryptococcus* sont des levures encapsulées présentes dans l'environnement. Elles sont retrouvées couramment dans le sol, les arbres et les excréments aviaires, en particulier dans les fientes de pigeons.

Cryptococcus spp. se présente sous forme de levure ronde (environ 5 à 7 µm de diamètre) et bourgeonnante, qui a la particularité d'être entourée d'une épaisse capsule polysaccharidique (17) (Figure 7).

Outre sa contribution à la virulence, la capsule est importante sur le plan diagnostique puisque la recherche de l'antigène glucurono-xylo-mannane (GXM) peut être réalisée dans différentes matrices (sérum, plasma, sang total et liquide céphalo-spinal) (18).



Figure 7 : Observation de la capsule polysaccharidique de *Cryptococcus neoformans* visualisée à l'aide d'encre de Chine par microscopie optique.

Cryptocoque identifié en microscopie optique par coloration à l'encre de Chine dans un liquide céphalo-spinal (LCS) d'un cas de cryptococcose neuro-méningée (Dr Camille CORDIER).

Au sein des 37 espèces connues de cryptocoques, les complexes d'espèces *Cryptococcus neoformans* et *Cryptococcus gattii* sont les principaux cryptocoques pathogènes pour l'homme (19) (Figure 8).

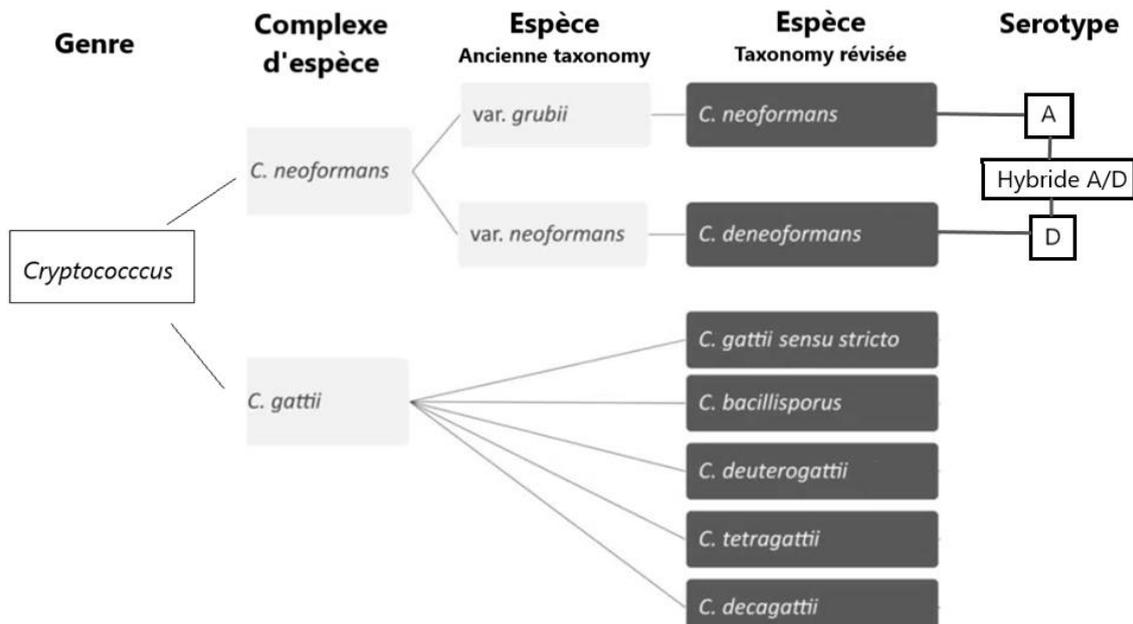


Figure 8 : Classification des cryptocoques d'intérêt médical.

Adapté (Chloë LEMAIRE) de la Société Française de Microbiologie (17)

L'infection cryptococcique commence généralement par l'inhalation de levures ou basidiospores environnementaux dans les alvéoles pulmonaires.

Chez le patient immunocompétent, cette infection est généralement asymptomatique, ou spontanément résolutive. Le cryptocoque peut alors être éradiqué par le système immunitaire de l'hôte ou, moins fréquemment, il peut survivre et persister de manière latente. Cette phase de latence peut durer plusieurs années, pouvant être à l'origine d'une réactivation et d'une dissémination lors d'une future immunosuppression de l'hôte (20).

Chez le patient immunodéprimé, la cryptococcose débute classiquement par une atteinte pulmonaire entraînant une pneumopathie, ou une dissémination chez l'hôte. Au cours d'une phase de dissémination, la levure franchit la barrière hémato-encéphalique et affecte le système nerveux central. La méningo-encéphalite disséminée est la forme clinique la plus fréquente de la cryptococcose (17).

La cryptococcose est plus fréquemment rencontrée chez les patients immunodéprimés, plus particulièrement ceux infectés par le VIH (virus de l'immunodéficience humaine) avec un taux de CD4 inférieur à 200/mm³, ou chez des patients ayant un autre facteur d'immunodépression tels que les patients greffés d'organes solides, atteints d'hémopathie maligne, ou encore les patients diabétiques (21). Elle est néanmoins de plus en plus souvent mise en évidence chez des patients

immunocompétents, et plus particulièrement lors d'infections par les espèces du complexe *gattii*.

Le diagnostic et le traitement de la cryptococcose ont été récemment révisés par les sociétés expertes (22).

Le diagnostic de cryptococcose est réalisé par la mise en évidence de levures par l'examen direct à l'encre de Chine ou la culture de l'échantillon prélevé. La détection de l'antigène polysaccharidique capsulaire GXM est également un argument diagnostique fort (17).

Le traitement antifongique des formes graves (méningo-encéphalites ou pneumopathies sévères) repose sur une phase d'induction par l'association d'amphotéricine B liposomale et de 5-fluorocytosine pendant au moins deux semaines. Le fluconazole est la molécule de choix pour les phases de consolidation et de maintenance. En cas de traitement, la mortalité précoce reste de l'ordre de 27 % chez les patients non VIH et de 14 % chez les patients VIH (17).

3. *Malassezia* spp.

Les levures du genre *Malassezia*, autrefois appelées *Pityrosporum*, font partie intégrante de la flore cutanée (23).

Les levures du genre *Malassezia* sont lipophiles, ce qui signifie que leur croissance est dépendante des lipides présents dans leur environnement. Cette caractéristique explique leur prépondérance pour les zones de la peau riches en sébum, telles que le thorax, le visage et le cuir chevelu (24). Cette lipo-dépendance en fait un genre fongique difficilement cultivable sur les milieux gélosés traditionnels.

En microscopie, ces levures apparaissent sous forme ronde à ovale et mesurent entre 3 et 8 µm. Elles peuvent présenter une morphologie caractéristique en forme de « cacahuète » ou « empreinte de pas », résultant d'un bourgeonnement monopolaire des cellules. (25)

Le genre *Malassezia* comprend actuellement 18 espèces. Parmi celles-ci, 10 ont été isolées de la peau humaine, tandis que les autres sont des espèces zoophiles.

Malassezia restricta, *Malassezia globosa* et *Malassezia sympodialis* sont les plus fréquemment retrouvées au sein de la flore cutanée humaine. La répartition des espèces de *Malassezia* varie en fonction de leurs hôtes et des éventuelles pathologies qu'elles entraînent (Tableau 1). Les affections humaines sont pour la plupart

dermatologiques, comme la dermatite atopique affectant la tête et le cou, la dermatite séborrhéique, le *pityriasis versicolor* et la folliculite à *Malassezia* spp. (23).

Tableau 1 : Les différentes espèces de *Malassezia*, leurs principaux hôtes mammifères, et pathologies associées (26).

<i>Malassezia</i> species	Synonyms	Presence on healthy skin	Presence in lesions
<i>M. furfur</i>	<i>Pityrosporum ovale</i>	In humans Sometimes in animals	In humans (PV, FG)
<i>M. pachydermatis</i>	<i>P. pachydermatis</i> , <i>P. canis</i>	In dogs, cats, many others (mostly canids) Sometimes in humans (dog contact)	In dogs, cats, others (SD, OT) Sometimes in humans (FG)
<i>M. sympodialis</i>	<i>M. furfur</i> serovar A	In humans and animals	In humans (AD, SD) Sometimes in cats (OT)
<i>M. globosa</i>	<i>P. orbiculare</i> <i>M. furfur</i> serovar B	In humans and animals	In humans (PV, SD, AD) Sometimes in cats (OT)
<i>M. obtusa</i>		In humans	In humans
<i>M. slooffiae</i>		In pigs, cats (claws) In humans	In humans
<i>M. restricta</i>	<i>M. furfur</i> serovar C	In humans	In humans (SD)
<i>M. dermatis</i>		In humans	In humans (AD)
<i>M. japonica</i>		In humans	In humans (AD, SD)
<i>M. nana</i>		In cats, horses	In cats, cattle (OT)
<i>M. yamatoensis</i>		In humans	In humans (SD)
<i>M. caprae</i>		In goats	
<i>M. equina</i>	<i>M. equi</i>	In horses	In horses
<i>M. cuniculi</i>		In rabbits	
<i>M. arunalokei</i>		In humans	In humans
<i>M. brasiliensis</i>		In parrots	–
<i>M. psittaci</i>		In parrots	–
<i>M. vespertilionis</i>		In hibernating bats	–

–, not reported; PV, pityriasis versicolor; FG, fungaemia; AD, atopic dermatitis; SD, seborrheic dermatitis; OT, otitis.

Bien que l'implication des espèces de *Malassezia* dans les affections cutanées soit avérée, les mécanismes par lesquels ces levures évoluent d'un état commensal à un état pathogène restent encore à élucider. Il semble exister un équilibre entre *Malassezia* et l'hôte, entraînant une prolifération excessive des levures à la surface de la peau au cours d'un déséquilibre. La multiplication de *Malassezia* spp. peut être favorisée par divers facteurs, notamment des modifications cutanées telles qu'une

augmentation de la production de sébum, une humidité excessive, ou encore une altération des défenses immunitaires (27).

Seules trois espèces de *Malassezia* ont été identifiées comme responsables de fongémie : *Malassezia furfur* pour la grande majorité, puis *Malassezia pachydermatis*, et *M. sympodialis* (29).

La plupart des cas de fongémie à *Malassezia* spp. ont été observés chez des nouveau-nés (82 cas, 67,2 %) (29). En France, le CNRMA a identifié *M. furfur* et *M. pachydermatis* comme les principaux agents responsables de fongémie à *Malassezia* spp. (CNRMA, rapport 2017).

Ces espèces sont capables de coloniser la peau des patients et du personnel hospitalier, suggérant que la porte d'entrée est probablement cutanée. En effet, *M. pachydermatis* a été isolée des mains de professionnels de santé propriétaires de chiens au sein d'un *cluster* d'infections chez des nouveau-nés (7). *M. restricta* est l'espèce la plus abondante de la flore cutanée de l'homme, il est donc surprenant de constater que cette espèce n'a jusqu'à présent jamais été isolée comme agent de fongémie (30).

La perfusion de lipides et la nutrition parentérale apparaissent comme des facteurs de risque majeurs de fongémie à *Malassezia* spp., bien que des cas indépendants de la nutrition intraveineuse aient également été décrits. Ces fongémies se manifestent principalement chez des patients fortement immunodéprimés porteurs d'un cathéter veineux central (CVC), ce qui souligne l'importance de cette porte d'entrée (7). Plusieurs facteurs de virulence potentiels ont été identifiés chez ces souches, notamment leur capacité à produire des biofilms (29).

Pour confirmer la présence de ces levures au cours d'affections cutanées, l'apposition d'un ruban adhésif, le grattage cutané ou l'écouvillonnage des lésions peuvent être utilisés. L'examen direct est l'examen de première intention afin de visualiser des levures bourgeonnantes (23).

Au laboratoire de mycologie, les infections à *Malassezia* spp. sont probablement sous-diagnostiquées du fait de l'utilisation de milieux de culture standards ou chromogènes peu enrichis en lipides. *M. pachydermatis* est la seule espèce pouvant se développer sur milieu Sabouraud non supplémenté, probablement du fait d'une source suffisante de lipides dans les peptones présents dans la composition de la gélose Sabouraud (31). En cas de suspicion d'infection à

Malassezia spp., il est donc recommandé d'utiliser des milieux de culture riches en lipides, tels que les milieux de Dixon, de Leeming-Notman, CHROMagar™ *Malassezia* ou également le milieu MalaSelect récemment développé (32) . Pour les laboratoires ne disposant pas de ces milieux, l'ajout de Tween ou d'huile d'olive sur une gélose Sabouraud peut être une alternative efficace (33). L'identification à l'espèce, en cas de culture positive, sera réalisée par spectrométrie de masse MALDI-ToF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time of Flight*).

Pour le diagnostic des fongémies à *Malassezia* spp., il a été démontré que le système d'hémoculture automatisé BacT/Alert n'est pas efficace pour détecter *M. furfur* (34) (35). En revanche, il permet de détecter *M. pachydermatis*, dont la culture est moins exigeante.

Le traitement des pathologies dermatologiques causées par *Malassezia* spp. repose sur l'utilisation d'antifongiques topiques, tels que les azolés (23).

Les éléments clés dans le traitement des infections invasives à *Malassezia* spp. sont le retrait du CVC, l'arrêt de l'administration parentérale de lipides et l'initiation d'un traitement antifongique systémique. La molécule antifongique de première intention est l'amphotéricine B liposomale (7) (29).

C. Les infections à *Trichosporon* spp. et *Rhodotorula* spp.

1. Généralités

a. *Trichosporon* spp.

Les levures du genre *Trichosporon* sont saprophytes de l'environnement, elles sont retrouvées au sein de zones aquatique ou tellurique, dans du fromage ou des excréments d'animaux. Ces levures cosmopolites à prédominance tropicale font occasionnellement partie du microbiote gastro-intestinal et buccal, et peuvent coloniser de manière transitoire les voies respiratoires, ainsi que la peau (36) (37). Le genre *Trichosporon* a été nommé pour la première fois en 1865 par Hermann Beigel, qui a observé cette levure au cours d'une infection des cheveux : la piedra blanche. Par conséquent, le mot *Trichosporon* tire son origine du grec *Trichos* (cheveux) et *Sporon* (spores) (36).

Les espèces du genre *Trichosporon* ont initialement toutes été regroupées sous le nom de *Trichosporon beigeli*. Les techniques de biologie moléculaire ont ensuite permis de classer une cinquantaine d'espèces différentes de *Trichosporon* (38). La taxonomie des *Trichosporon* spp. a depuis été redéfinie en les divisant en trois genres

distincts : *Trichosporon*, *Cutaneotrichosporon* et *Apiotrichum*. À l'heure actuelle, 16 espèces sont présentes au sein du genre *Trichosporon* (39).

Quatre espèces sont plus couramment rencontrées en pathologie humaine : *Trichosporon asahii*, *Trichosporon asteroides*, *Trichosporon inkin* et *Trichosporon ovoides* (40) (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification et composition non exhaustives des genres *Trichosporon*, *Cutaneotrichosporon* et *Apiotrichum*.

D'après *Taxonomy National Library of Medicine* (38).

<i>Trichosporon</i>	<i>Cutaneotrichosporon</i>	<i>Apiotrichum</i>
<i>T. asahii</i> <i>T. asteroides</i> <i>T. inkin</i> <i>T. ovoides</i> <i>T. coremiiforme</i> <i>T. dohaense</i> <i>T. faecale</i> <i>T. japonicum</i> <i>T. lactis</i> <i>T. aquatile</i> <i>T. austroamericanum</i> <i>T. beigelii</i> <i>T. caseorum</i> <i>T. infestans</i> <i>T. insectorum</i> <i>T. multisporum</i>	<i>C. cutaneum</i> <i>C. dermatis</i> <i>C. jirovecii</i> <i>C. mucoides</i>	<i>A. domesticum</i> <i>A. loubieri</i> <i>A. mycotoxinovorans</i> <i>A. montevideense</i>

b. *Rhodotorula* spp.

Le genre *Rhodotorula* appartient à la famille des *Sporidiobolaceae*, conjointement avec le genre *Sporobolomyces*. Ces deux genres sont très proches en culture avec des colonies d'aspect rose à rouge (41) (Figure 9).

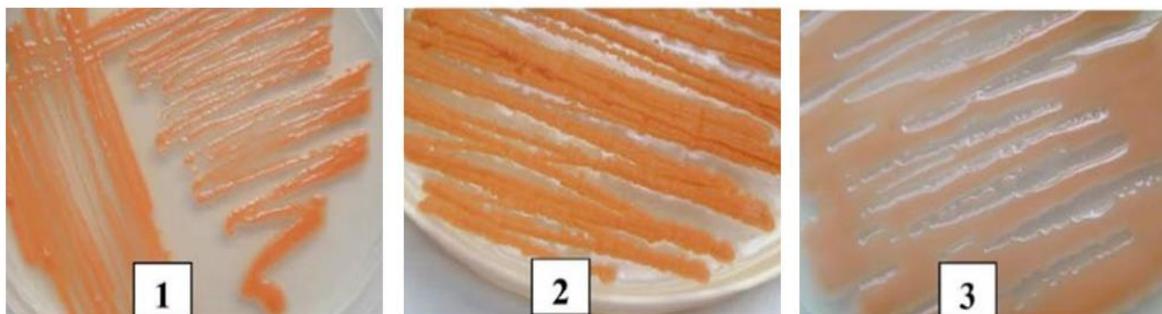


Figure 9 : Aspect de colonies de trois espèces de la famille des *Sporidiobolaceae* sur gélose PDA (*Potato Dextrose Agar*).

(1) *Sporidiobolus pararo-seus*, (2) *Rhodotorula mucilaginosa*, (3) *Rhodotorula glutinis*. (42)

Le genre *Rhodotorula* contient de nombreuses espèces dont trois ont été décrites en pathologie humaine : *Rhodotorula mucilaginosa* (anciennement connue sous le nom de *Rhodotorula rubra*), *Rhodotorula glutinis* et *Rhodotorula minuta*. (syn. *Cystobasidium minutum*) (7).

R. mucilaginosa est fréquemment isolée au sein de la flore cutanée (y compris des ongles). Elle peut également être mise en évidence dans les voies respiratoires et digestives. *R. mucilaginosa* est omniprésente dans l'environnement, elle se développe dans l'eau, les aliments et boissons, le sol, mais également sur des matériaux plastiques comme des rideaux de douche. Cette capacité proliférative sur des matières abiotiques est un problème pour les patients porteurs de cathéters (7).

En comparaison à *R. mucilaginosa*, *R. glutinis* et *R. minuta* sont deux espèces moins fréquemment rencontrées. Elles sont rarement isolées de la flore humaine, on peut néanmoins les trouver dans des prélèvements environnementaux comme l'eau et l'air (43).

2. Infections superficielles

a. *Trichosporon* spp.

La piedra blanche est une infection fongique superficielle du cheveu et du poil, causée par des espèces du genre *Trichosporon*. L'origine espagnole du mot « piedra », qui signifie « pierre », fait référence à la présence de nodules d'environ un à trois millimètres de diamètre le long des cheveux ou des poils (44). La piedra blanche est plus fréquente dans les régions chaudes et tropicales du monde, en particulier l'Amérique du Sud, ou encore les États-Unis (45).

Il existe deux types de piedra (Figure 10) :

- la piedra blanche, causée par les levures du genre *Trichosporon*, se caractérisant par des nodosités molles de couleur blanc-jaunâtre et,
- la piedra noire, provoquée par un ascomycète (*Piedraia hortae*) essentiellement en zone tropicale, avec la présence de nodosités dures et brunes foncées fragilisant le cheveu (44).

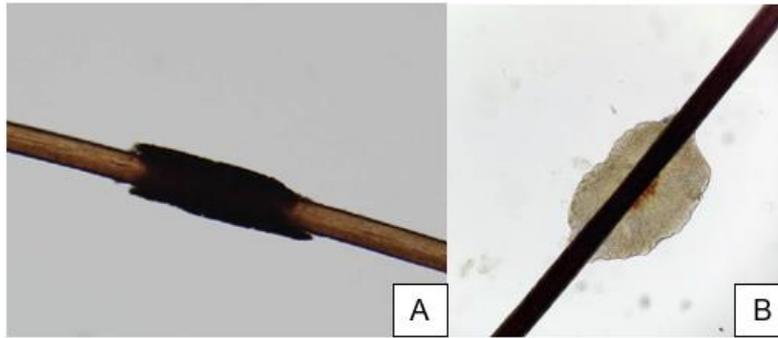


Figure 10 : Examen au microscope optique de cheveux atteints de piedra.

(A) *piedra noire* (@ Eric Hossler (46)), (B) *piedra blanche* (44)

En dehors du problème esthétique, la piedra blanche est généralement asymptomatique, ou légèrement prurigineuse. Elle n'entraîne pas de plaques d'alopecies. L'infection peut toucher pratiquement toutes les zones pileuses, mais touche principalement le cuir chevelu (45).

Dans une étude portant sur 14 cas de piedra blanche, Bonifaz *et al.* ont démontré qu'elle touchait plus particulièrement les femmes (n = 13/14). L'âge moyen était de 16,25 ans. Le cuir chevelu était la zone la plus fréquemment touchée, un seul sujet présentait une atteinte scrotale associée à une atteinte du scalp. Parmi les 14 souches identifiées, les principales espèces étaient :

- *T. inkin* (n = 11, 78,5 %),
- *T. ovoïdes* (n = 2, 14,3 %) et,
- *Cutaneotrichosporon cutaneum* [syn. *T. cutaneum*] (n = 1, 7,2 %) (47).

Les cheveux longs sont apparus comme un facteur prédisposant (n = 13/14), probablement en raison de leur capacité à retenir l'humidité, ce qui favorise le développement du champignon. Des cas de transmission interhumaine ont été décrits en cas de forte promiscuité, ou par le partage de produits de coiffure (45).

Le diagnostic peut être évoqué par une fluorescence négative à la lampe de Wood et la visualisation de nodules blanchâtres par dermoscopie du cuir chevelu (Figure 11).

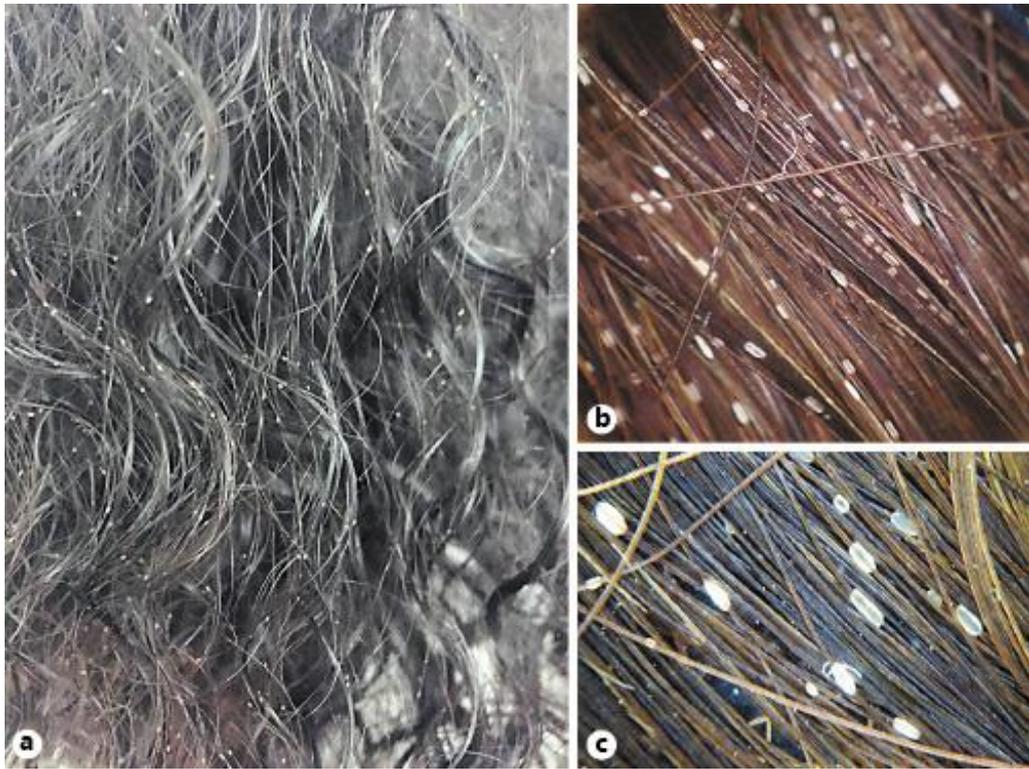


Figure 11 : Présentation clinique d'une piedra blanche.

(a) nodules visibles à l'œil nu, (b) nodules blancs visualisés par dermoscopie, (c) vue rapprochée des nodules par dermoscopie. (47)

Le diagnostic de confirmation est réalisé au laboratoire, par la visualisation et l'isolement en culture de l'agent étiologique. Afin de faciliter la visualisation des éléments fongiques, les cheveux sont traités par une solution de potasse (KOH, 10 à 15 %). L'examen microscopique entre lame et lamelle permet la visualisation d'amas d'arthrospores et de blastospores, enchâssés dans une matrice extracellulaire adhérente au cheveu. Des colorations, comme le noir de chlorazole ou le bleu de lactophénol, peuvent aider à la visualisation de ces éléments fongiques.

La culture sur milieu Sabouraud du prélèvement permet l'obtention de colonies blanches en 24 à 48 heures à une température de 30-37°C. L'aspect poudreux ou cérébriforme des colonies diffère en fonction des espèces (Figure 12a). L'état frais entre lame et lamelle permet l'observation d'hyphes hyalins, de blastoconidies et surtout d'arthroconidies (Figure 12b). L'identification de l'espèce peut être obtenue rapidement à partir de la culture par spectrométrie de masse MALDI-ToF, ou par séquençage panfongique (47).

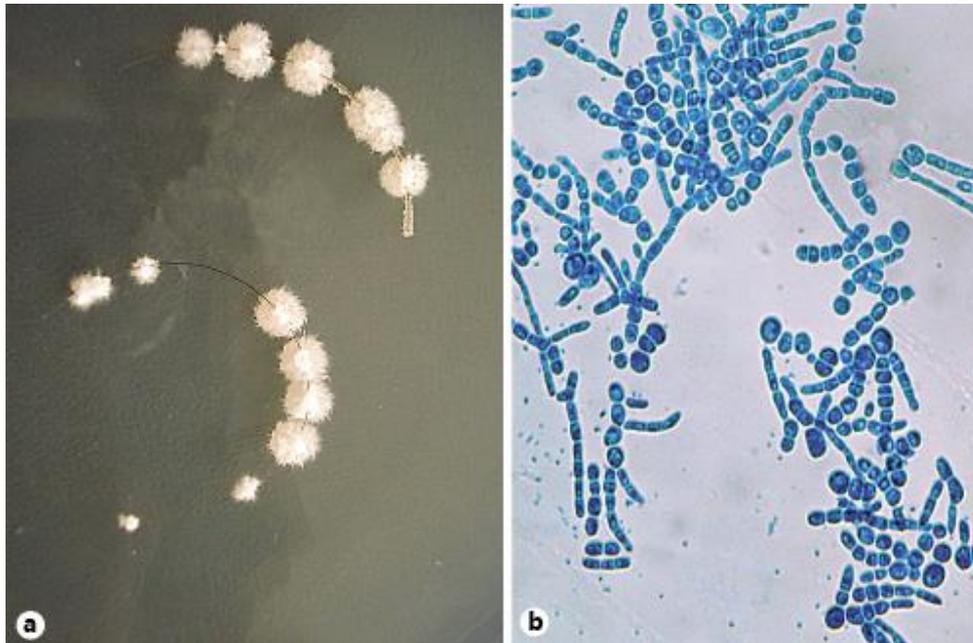


Figure 12 : Aspect macroscopique et microscopique de *T. inkin* en culture.

(a) colonies de *T. inkin* sur milieu Sabouraud, (b) arthroconidies et blastoconidies d'une colonie de *T. inkin* (coloration au bleu de lactophenol, objectif x100) (47).

Il est recommandé, lorsque cela est possible, de raser les poils ou les cheveux atteints afin de diminuer la charge fongique.

Les imidazolés topiques sont les molécules antifongiques les plus utilisées. Dans l'étude de Bonifaz *et al.*, un mois de traitement quotidien par shampoing de kétoconazole à 2 % a permis une amélioration clinique dans 80 % des cas. Les shampoings à base de cyclopiroxolamine, antifongique de la famille des pyridones sont également efficaces (47). L'utilisation d'imidazolés par voie *per os* peut être envisagée en cas de récurrences.

En dehors de la piedra blanche, *Trichosporon* spp. peut être occasionnellement impliqué dans des cas d'onychomycose et d'atteintes de la peau. Chez les patients immunodéprimés, des cas de trichosporonoses cutanées disséminées ont été décrits, caractérisés par des papules étendues ou la présence de nodules (44).

b. *Rhodotorula* spp.

Levure de la flore commensale humaine, *Rhodotorula* spp. est très rarement impliquée dans des infections superficielles.

Néanmoins dans des contextes d'immunodépression, des cas d'ulcères cutanés (48), d'ulcères buccaux et de plaques érythémateuses (49) ont été décrits

dans la littérature. Un traitement antifongique bien conduit a permis une disparition des lésions, confirmant l'agent étiologique incriminé.

R. mucilaginosa a également été décrit comme agent causal d'onychomycose (50). Malgré la mise en évidence de propriétés kératolytiques de cette espèce, il est nécessaire d'interpréter une culture positive avec prudence du fait de sa présence fréquente au niveau de la peau et des ongles. Des prélèvements itératifs sont recommandés afin de confirmer la présence de la levure, et doivent être corrélés aux éléments cliniques et aux éventuels facteurs d'immunodépression du patient.

3. Infections invasives

a. *Trichosporon* spp.

Une revue de la littérature réalisée par J. de Almeida Júnior *et al.* a résumé les cas d'infections invasives à *Trichosporon* spp. publiés entre 1994 et 2015. Les auteurs ont recensé les infections disséminées, généralement des fongémies, pouvant être associées à des métastases septiques (cutanées, pulmonaires, hépatiques ou spléniques) et des infections profondes localisées : comme les péritonites, les infections pulmonaires, cérébrales, oculaires, urinaires et œsophagiennes (40).

Parmi les 253 cas d'IFI à *Trichosporon* spp., 79 (31,2 %) concernaient des patients atteints d'hémopathie maligne, principalement représentés par les patients atteints de leucémie aiguë (n = 57, 75 %). Au moment du diagnostic d'infection à *Trichosporon* spp., 67 des patients atteints d'hémopathie maligne (84,8 %) étaient neutropéniques. De plus, 36 patients (45,5 %) étaient porteurs d'un CVC (7) (40).

Kimura *et al.* ont également objectivé une incidence plus élevée des fongémies à *Trichosporon* spp. chez les patients neutropéniques et greffés de cellules souches hématopoïétiques (51). Cette population apparait comme la plus touchée également dans l'étude de Shin-Huei Kuo *et al.*, qui a identifié le cathéter intravasculaire comme porte d'entrée principale de fongémie à *Trichosporon* spp. (40). Les trichosporonoses invasives ont également été identifiées chez des patients transplantés d'organe solide, atteints de tumeurs solides ou de maladies auto-immunes.

Les facteurs de risque identifiés étaient la préexposition à une antibiothérapie à large spectre, la présence d'un terrain particulier (brûlure étendue, polytraumatisme, ...) et l'hospitalisation dans une unité de soins intensifs. D'autres cas ont été déclarés en post-opératoire, et également chez des patients dialysés (hémodialyse et dialyse péritonéale) (40). Dans son rapport de 2021, le CNRMA a

constaté que les fongémies à *Trichosporon* spp. étaient étroitement associées aux hémopathies malignes et à une exposition préalable à la caspofungine.

Dans la revue de la littérature réalisée par João N. de Almeida Júnior *et al.*, le diagnostic d'IFI à *Trichosporon* spp. (n = 203) reposait sur une culture positive à partir d'un échantillon clinique.

T. asahii était le principal agent étiologique des IFI à *Trichosporon* spp., suivi de « *Trichosporon* spp. » et de *T. inkin*. En effet, dans 69 cas (33,9 %), aucune identification à l'espèce n'a pu être réalisée (Figure 13). L'identification des espèces a été réalisée par biologie moléculaire, notamment par le séquençage des régions *IGS1* (*Intergenic spacer 1*) (n = 22), *ITS1* (*Internal transcribed spacer 1*) (n = 15) ou du domaine *D1/D2* des régions 26S du gène de l'ARN ribosomique (n = 15). La région *IGS1* a été identifiée comme étant discriminante pour la différenciation des levures du genre *Trichosporon* (40).

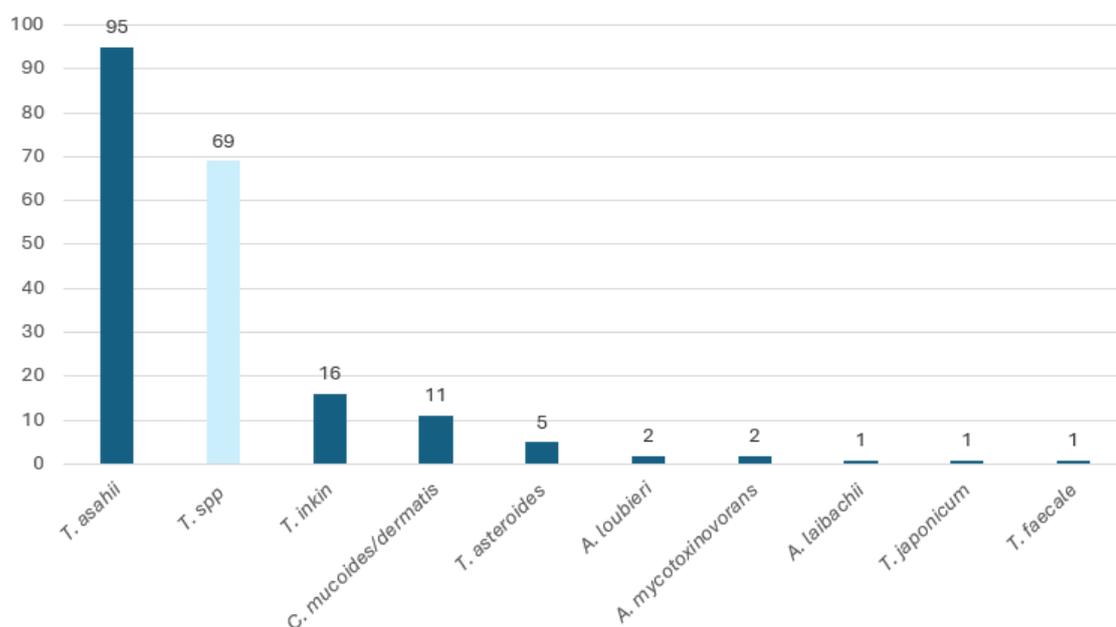


Figure 13 : Répartition des espèces responsables d'IFI à *Trichosporon* spp. (et aux nouveaux genres *Cutaneotrichosporon* et *Apiotrichum*) rapportées dans la littérature de 1994 à 2015.

D'après les données de João N. de Almeida Júnior *et al.* (40).

Dans l'étude de Shin-Huei Kuo *et al.*, *T. asahii* était l'espèce la plus fréquemment isolée (73 %), suivie de *C. dermatis* (11,3 %), *Apiotrichum montevidense* (6,1 %) et *T. faecale* (5,2 %). Il existe une variation de la prévalence des espèces, autres que *T. asahii*, responsables d'IFI selon la zone géographique (7) (52).

Au cours des trois dernières années, des cas groupés d'IFI à *T. inkin* ont été décrits dans un contexte de transplantation cardiaque à l'hôpital de la Pitié-Salpêtrière. Dans le même contexte, un cas a aussi été identifié au CHU de Lille (données non publiées).

c. *Rhodotorula* spp.

Rhodotorula spp. est de plus en plus fréquemment décrit comme agent pathogène opportuniste responsable d'IFI.

Une revue de la littérature de *P. Ioannou et al.* a été réalisée sur 248 cas d'IFI à *Rhodotorula* spp. Les IFI les plus fréquentes étaient les fongémies dans 61,7 % des cas (153 patients), suivies des infections du système nerveux central (21,4 %) (53).

Concernant les fongémies à *Rhodotorula* spp., la majorité des patients étaient atteints de cancers (68,4 %), plus particulièrement d'hémopathies malignes (67,1 %). Au sein de cette population d'hématologie, les plus touchés étaient les patients recevant une chimiothérapie et les patients greffés de CSH (cellules souches hématopoïétiques).

Parmi les facteurs de prédisposition aux fongémies à *Rhodotorula* spp., 81,6 % des patients étaient porteurs d'un CVC ou bénéficiaient d'une nutrition parentérale (34,7 %). De plus, 29,2 % des patients étaient neutropéniques. De rares cas ont également été rapportés en contexte post-chirurgical, chez des patients atteints du VIH ou de maladies auto-immunes (53).

Un tiers des patients étaient sous prophylaxie antifongique, le plus souvent par fluconazole (72,4 %) ou par amphotéricine B (10,3 %).

La majorité des fongémies à *Rhodotorula* spp. sont causées par *R. mucilaginosa* (65,4 %), *R. glutinis* (12,4 %) et *R. minuta* (2 %). Néanmoins, l'identification de l'espèce n'a pas été rapportée dans 20,3 % des cas (53) (Figure 14).

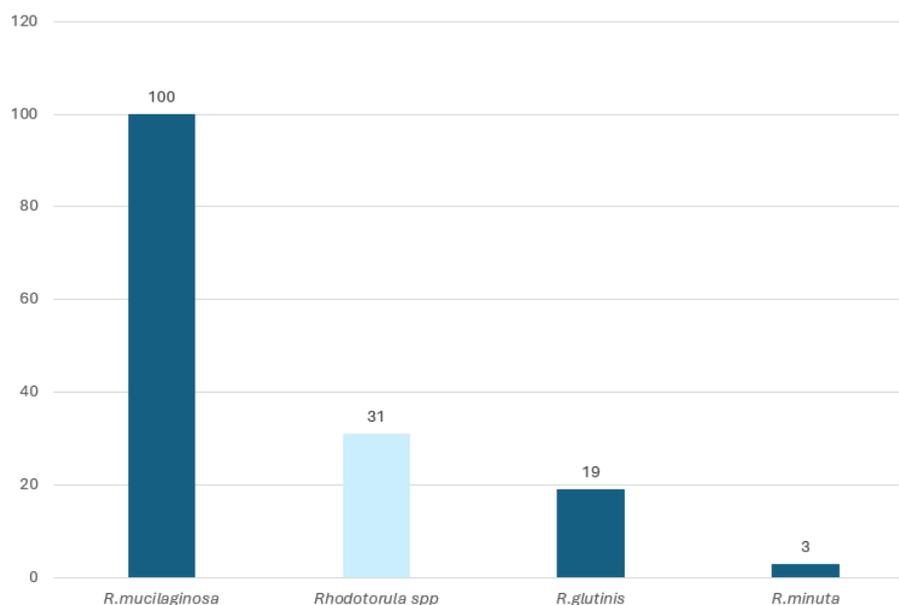


Figure 14 : Répartition des espèces responsables de fongémies à *Rhodotorula* spp. rapportées dans la littérature jusqu'à 2017.

D'après les données de P. Ioannou et al. (53).

L'infection du SNC (système nerveux central) à *Rhodotorula* spp. était la deuxième manifestation clinique la plus rencontrée après la fongémie (n = 53/248). Deux tiers des patients étaient atteints du VIH (n = 35/53), 32 d'entre eux étaient au stade SIDA (syndrome d'immunodéficience acquise). Les facteurs de risques d'infections du SNC à *Rhodotorula* spp. semblent donc très différents de ceux des fongémies. Au sein de ce spectre clinique, *R. mucilaginosa* reste l'espèce la plus rencontrée (53).

De rares cas d'infections oculaires (kératites et sclérites dans des contextes traumatiques ou chirurgicaux, et endophtalmies chez des patients usagers de drogues par voie intraveineuse) et de péritonites associées à la dialyse péritonéale ont été décrits (53).

D. Diagnostic biologique actuel des infections invasives à *Trichosporon* spp. et *Rhodotorula* spp.

1. Prélèvements et examen direct

Afin d'orienter le diagnostic d'IFI, des prélèvements de sites normalement stériles sont recommandés. Il peut s'agir de :

- biopsies, notamment pour l'examen histopathologique par des colorants comme le Gomori-Grocott ou la coloration PAS (*Periodic Acid Shif*),

- fluides biologiques provenant de sites stériles/profonds comme le LCS, le liquide péritonéal, un abcès profond, ou le plus souvent l'hémoculture.

L'examen direct de ces prélèvements est effectué par microscopie optique par l'intermédiaire de colorants de laboratoire (ex : Gram, bleu de toluidine).

L'examen direct peut orienter vers un genre fongique selon des éléments morphologiques qui restent néanmoins présents de façon hétérogène (Figure 15). Il est donc impossible de réaliser un diagnostic de certitude de genre par microscopie (7).

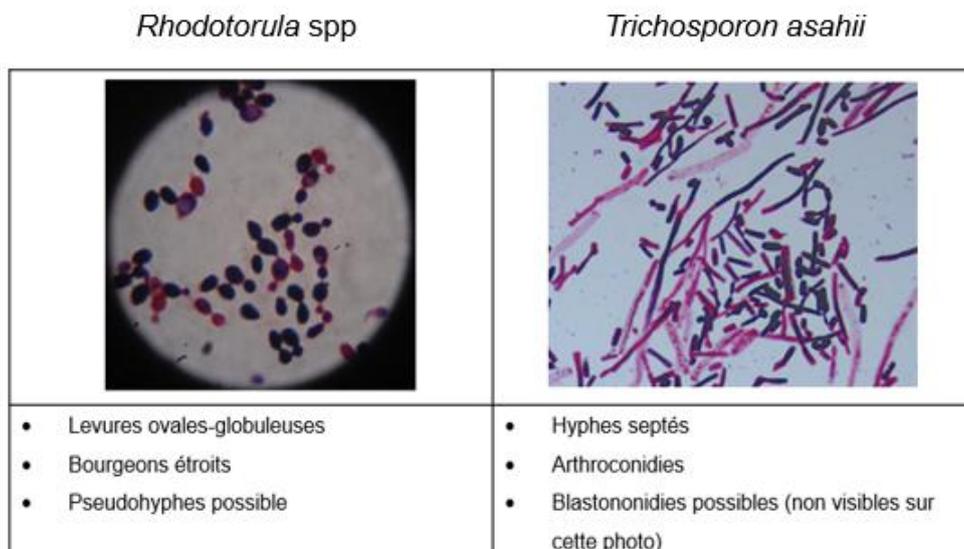


Figure 15 : Éléments morphologiques observés par microscopie optique en fonction des genres fongiques.

(A) frottis de colonies de *Rhodotorula spp.* (54), (B) frottis de colonies de *T. asahii* (55). Coloration de Gram observée par microscopie optique.

En cas de positivité de l'examen direct, une PCR panfongique ciblant des régions conservées des champignons (régions *ITS1/2* ou *28S*) peut être directement réalisée sur l'extrait d'ADN du prélèvement. Le séquençage panfongique peut donc permettre l'identification de l'agent fongique incriminé si la culture ne peut être réalisée, ou lorsque le patient est déjà traité par une molécule antifongique (7).

2. Culture

Une hémoculture négative ne permet pas d'infirmer le diagnostic de fongémie. En effet, la sensibilité des hémocultures réalisées en *ante mortem* dans les cas de candidoses invasives prouvées par autopsie variait entre 21 % et 71 % (56). Bien que

l'hémoculture semble être un examen de premier choix, la sensibilité est essentiellement limitée par le fait que les levures viables sont rapidement éliminées de la circulation (57). Le délai médian de positivité des hémocultures est généralement de 2 à 3 jours, pouvant s'étendre jusqu'à 8 jours (58).

La mise en culture de l'échantillon prélevé est néanmoins nécessaire afin d'obtenir un isolat pour réaliser le diagnostic d'espèce et les tests de sensibilité aux antifongiques.

Les caractéristiques macroscopiques des colonies diffèrent selon les espèces et les isolats (Tableau 3 et 4). Habituellement, les levures des genres *Trichosporon* et *Rhodotorula* poussent en 24 à 48 heures à une température comprise entre 28 et 37°C.

Tableau 3 : Photographies d'isolats de *R. mucilaginosa* en fonction des milieux de culture.

Photographies réalisées en macroscopie par Chloë LEMAIRE

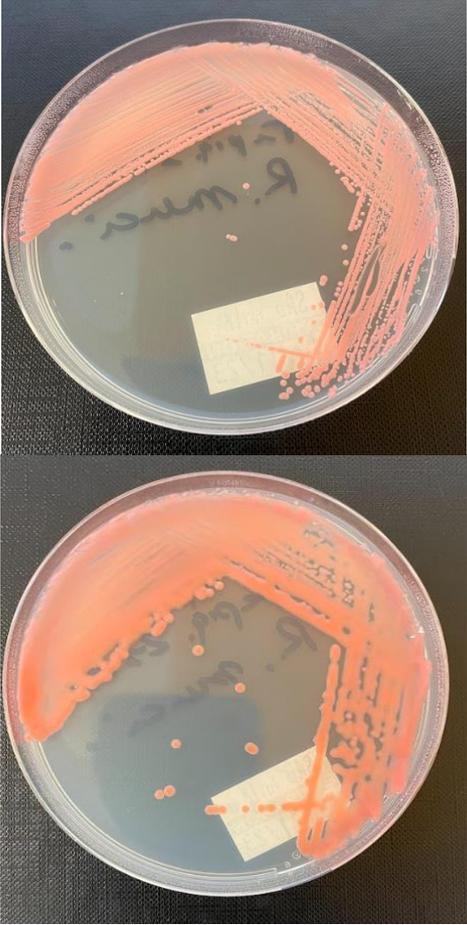
Gélose Sabouraud	Gélose CHROMagar™ <i>Candida</i>
	
<p>Colonies de couleur rose saumon à rouge corail (pigment caroténoïde). Aspect humide, brillant, voir mucoïde selon l'isolat (59).</p>	

Tableau 4 : Photographies de différentes espèces de levures du genre *Trichosporon* en fonction des milieux de culture.

Photographies réalisées en macroscopie par Chloë LEMAIRE.

Gélose Sabouraud	Gélose CHROMagar™ <i>Candida</i>
<i>T. inkin</i>	
	
<i>T. asahii</i>	
	
<i>T. faecale</i>	
	
<p>Petites colonies blanches crèmes, le plus souvent sèches et s'étalant sur la gélose, pouvant être poudreuses ou cérébriformes (60) (61).</p>	<p>Petites colonies pigmentées bleues/bleues-vertes. Les colonies peuvent prendre différentes teintes en cas d'incubation prolongée (rose à violet). Les colonies peuvent être poudreuses, muqueuses (<i>T. mucoides</i>) ou cérébriformes (62).</p>

L'identification de ces levures par méthodes phénotypiques telles que les galeries d'identification API® et les cartes Vitek Yeast Biochemical Card® (bioMérieux) ont démontré des limites. Certains articles ont rapporté des identifications d'espèce

erronées, voir une impossibilité d'identification. Bien que le test à l'uréase soit un élément d'orientation supplémentaire, les tests biochimiques semblent de plus en plus désuets (7).

La spectrométrie de masse MALDI-ToF est actuellement l'outil le plus fiable pour l'identification des levures communes. Il est toutefois recommandé d'incrémenter régulièrement des spectres protéiques dans les bases de données afin d'optimiser l'identification d'espèces de levures rares (41). Pour compléter les bases de données fournisseurs, la base de données MSI 2.0 (<https://msi.happy-dev.fr>) a notamment été créée afin d'améliorer l'identification des levures rares (Figure 16).

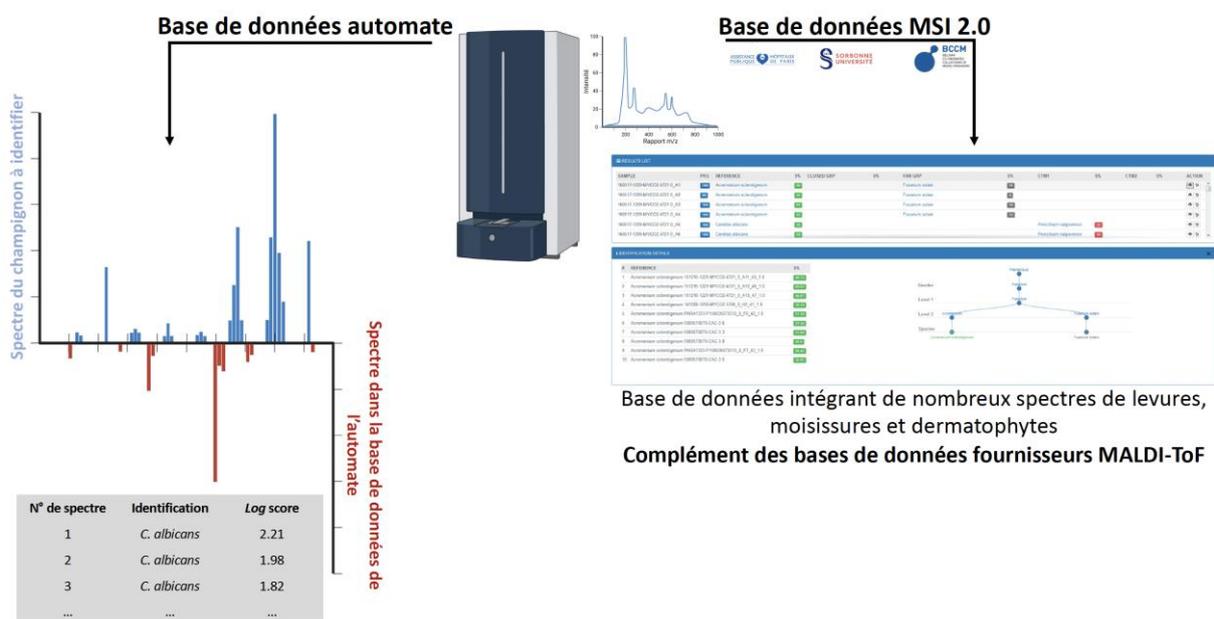
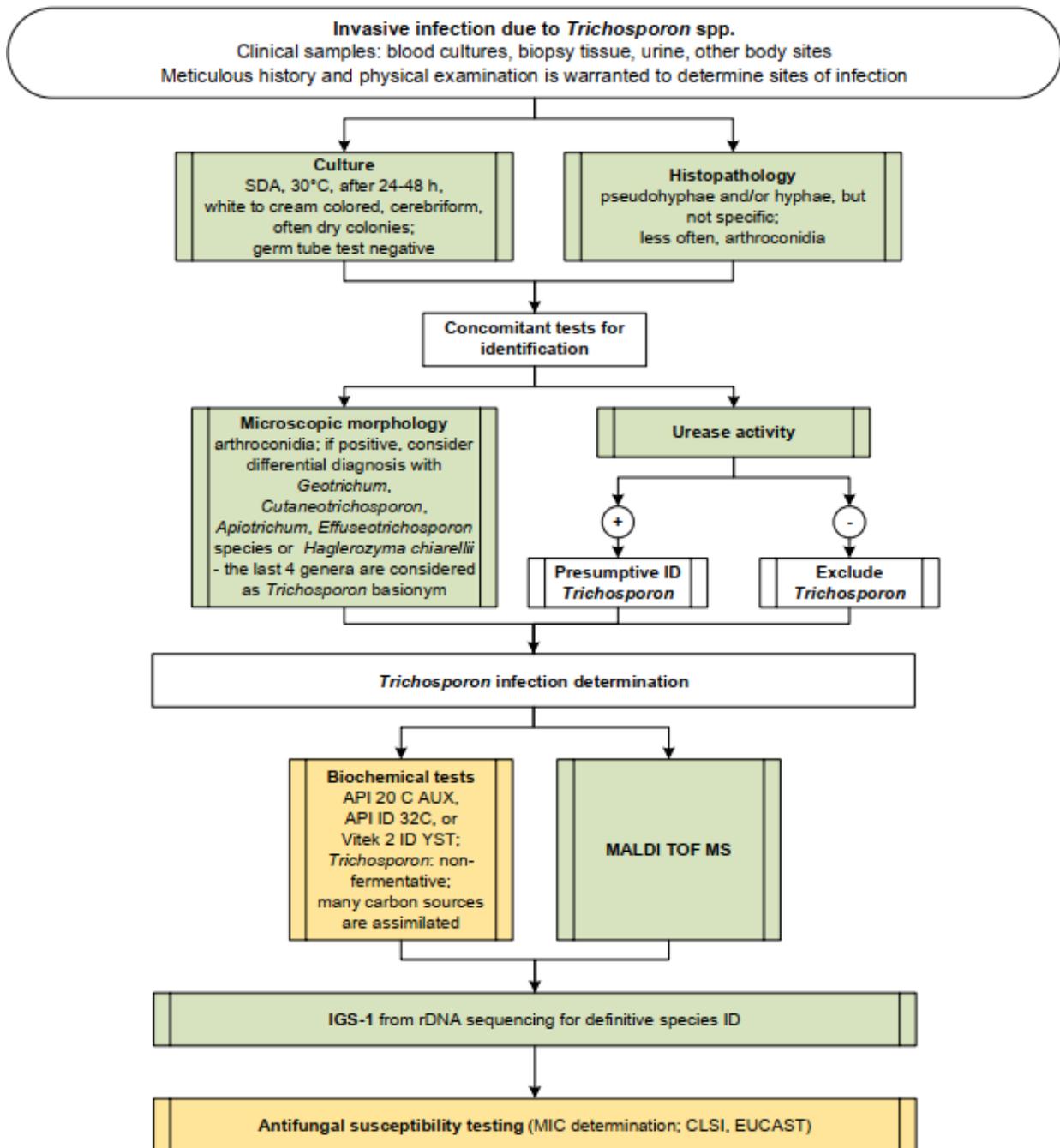


Figure 16 : Bases de données utilisées pour l'identification de levures rares.

Dr CORDIER Camille, BioRender.

Pour les situations cliniques d'intérêts, le séquençage des régions *IGS1* pour *Trichosporon* spp., ou *ITS* pour *Rhodotorula* spp. peuvent être utilisées à partir de l'extrait de l'ADN d'une souche (7) (Figure 17 et 18).



Legend:
 strongly recommended (green)
 moderately recommended (yellow)
 marginally recommended (orange)
 recommended against (red)

CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute; EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing; ID, identification; IGS, intergenic spacer; MALDI TOF MS, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry; MIC, minimum inhibitory concentration; SDA, Sabouraud dextrose agar

Figure 17 : Arbre diagnostique des trichosporonoses invasives selon l’ECMM/ISHAM établi en 2021 (7).

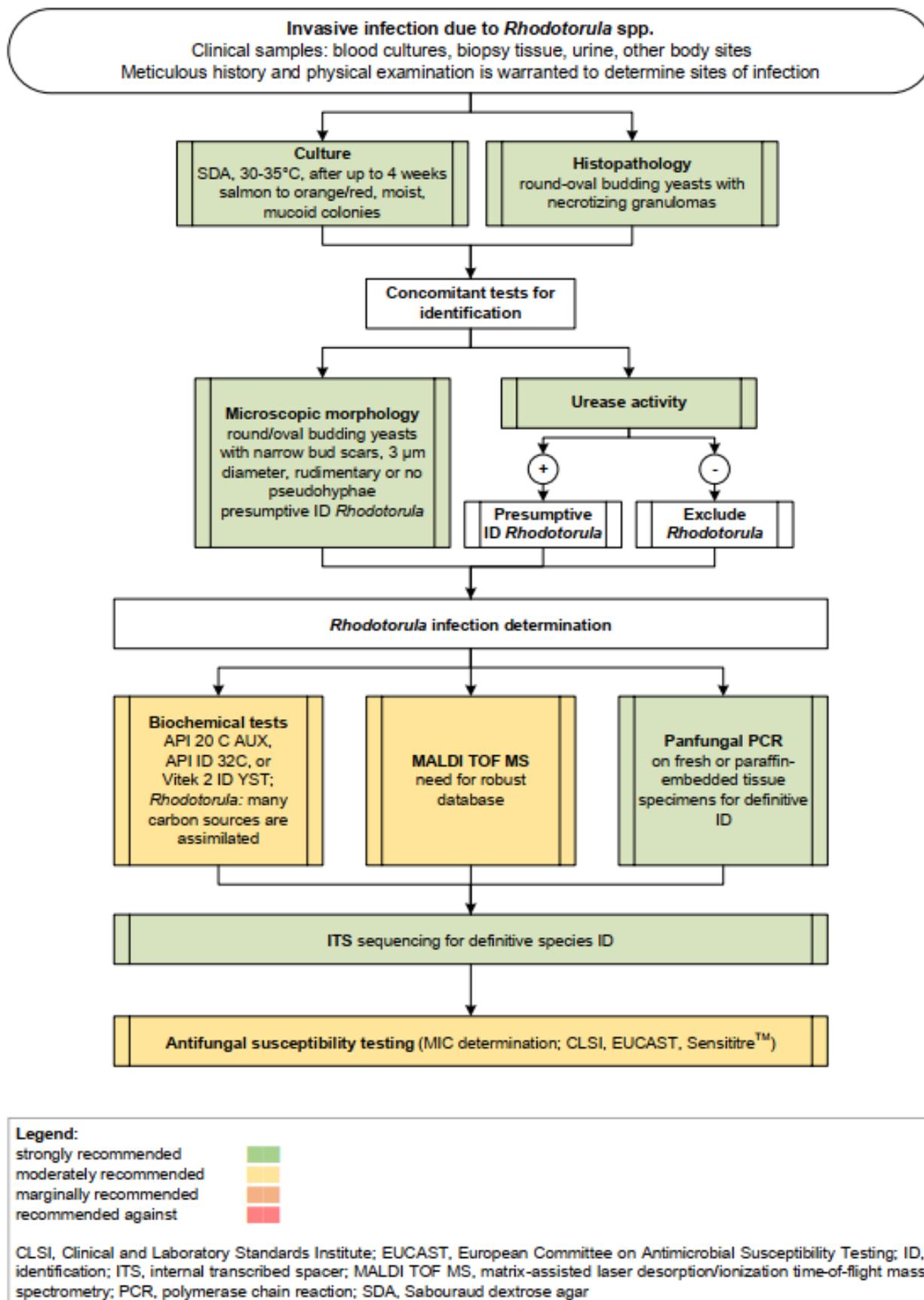


Figure 18 : Arbre diagnostique des rhodotoruloses invasives selon l'ECMM/ISHAM établi en 2021 (7).

3. Marqueurs sérologiques

À l'heure actuelle, il n'existe aucun test sérologique ou antigénique permettant la détection spécifique des levures des genres *Trichosporon* ou *Rhodotorula*.

Quelques études ont examiné l'intérêt du BDG, marqueur panfongique, dans les IFI à *Trichosporon* spp.

Les BDG sériques sont détectés chez 48 à 82 % des patients atteints d'IFI à *Trichosporon* spp. selon les études, bien que la majorité d'entre elles fasse état d'une positivité proche de 50 % (40) (63).

Au cours des IFI à *Rhodotorula* spp., les BDG sériques ne semblent pas être augmentés (64). Cependant, des recherches *in vitro* ont démontré la détection de BDG dans le surnageant de trois isolats de *R. mucilaginosa*, bien qu'à une concentration moyenne nettement inférieure à celle de *Candida* spp. (65).

Les BDG présentent donc un intérêt limité pour le diagnostic de ces IFI, du fait d'une faible valeur prédictive négative. Par conséquent, la recherche de BDG sériques chez les patients d'hémo-oncologie est faiblement recommandée par les sociétés expertes pour le dépistage de ces IFI (7).

Différentes levures de la famille des *Trichosporonaceae*, tels que les genres *Apiotrichum*, *Cutaneotrichosporon* et *Trichosporon* semblent produire un glucide très similaire au glucurono-xylo-mannane (GXM) de la capsule du cryptocoque (66).

Cet antigène GXM-like est détecté par les deux principaux tests disponibles pour le diagnostic de cryptococcose, le test d'agglutination au latex (LAT, *Latex Agglutination Test*) ainsi que le test de flux latéral (LFA, *Lateral Flow Assay*). Effectivement, il a été observé des résultats positifs de ces tests immunochromatographiques au cours d'IFI à *Trichosporon* spp.

Cette capacité à produire un antigène GXM-like a été récemment démontrée chez *Rhodotorula* spp. (67). Il a été observé une réaction croisée des tests LFA *in vitro* (sur souches) et *in vivo* sur dans des échantillons de sérum collectés d'animaux infectés à *Rhodotorula* spp. (68) (Figure 19).

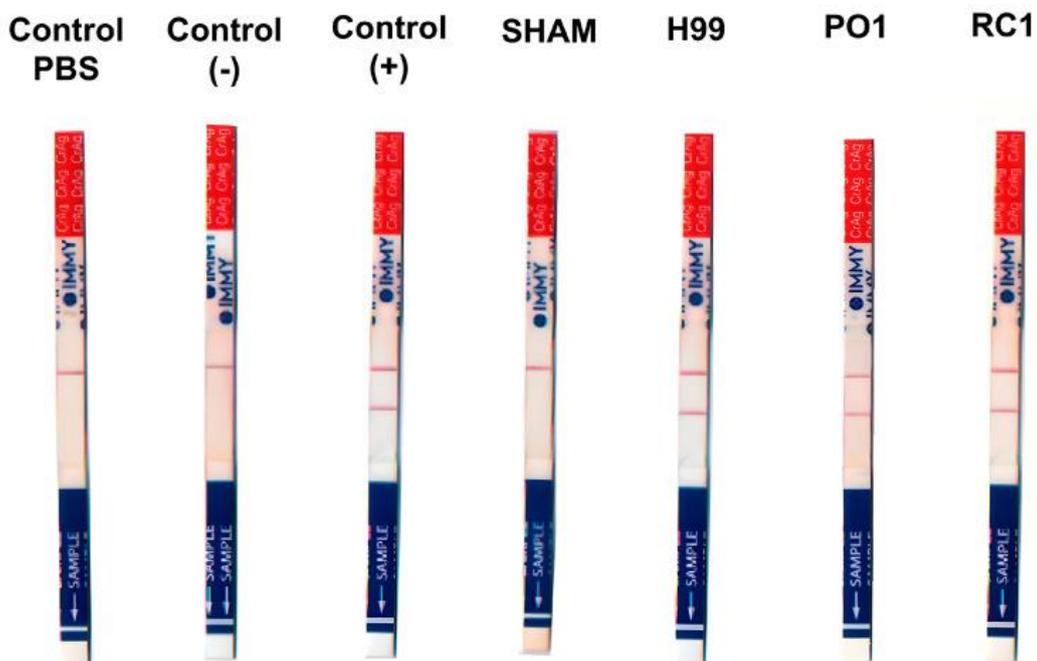


Figure 19 : Réaction croisée des tests CrAg®-LFA lors d'infection invasive à *R. mucilaginosa* chez l'animal.

Analyse CrAg®-LFA *in vivo* sur sérums collectés d'animaux infectés par des souches de *R. mucilaginosa* (PO1 et RC1) et de *C. neoformans* (H99). Contrôles négatifs provenant d'animaux non infectés (SHAM et PBS) (68).

Cependant, ces réactions croisées envers *R. mucilaginosa* et les *Trichosporonaceae* n'ont pas été analysées par le fournisseur du test CrAg®-LFA. Les cas de faux positifs à « *T. beigelii* » sont brièvement mentionnés dans le manuel du fournisseur (69).

Les sociétés expertes recommandent d'interpréter avec prudence les tests LAT ou LFA, utilisés pour le diagnostic de cryptococcose dans le LCS ou le sérum, dans le cadre d'une infection à *Rhodotorula* spp. ou *Trichosporon* spp. (7)

Les espèces du genre *Trichosporon* semblent partager des antigènes communs avec le genre *Aspergillus*. Certaines études ont objectivé une réaction croisée avec les kits de détection d'antigène galactomannane (70).

Selon les recommandations de 2013 de l'ESCMID/ECMM, la positivité concomitante des antigènes GXM et galactomannane peut être un indicateur de trichosporonose invasive. Cependant, la sensibilité et la spécificité de cette combinaison n'a pas été évaluée (41).

E. Prise en charge : un dialogue clinico-biologique ?

Les IFI à levures rares sont un défi thérapeutique en raison de leurs profils de sensibilité aux antifongiques et de l'absence de seuils d'interprétation, mais aussi de la pauvreté des études cliniques.

Afin d'harmoniser la prise en charge des infections à ces levures rares, des recommandations consensuelles ont été émises par différentes sociétés expertes : en 2013 par l'ESCMID et l'ECMM (41), et en 2021 par l'ECMM en coopération avec l'ISHAM et l'ASM (7).

1. Prise en charge thérapeutique

a. *Trichosporon* spp.

Toutes les espèces du genre *Trichosporon* sont intrinsèquement résistantes à la flucytosine et aux échinocandines (7).

La majorité des isolats de *Trichosporon* spp. sont résistants *in vitro* à l'amphotéricine B avec des CMI (Concentrations Minimales Inhibitrices) ≥ 1 mg/l, particulièrement *T. asahii*. L'amphotéricine B n'est donc pas un traitement de première intention dans les IFI à *Trichosporon* spp. (7).

Les molécules triazolés sont bien plus efficaces que les autres classes d'antifongiques. La plupart des espèces de *Trichosporon* ont des CMI faibles pour le voriconazole, le posaconazole et l'itraconazole (7). Le voriconazole est l'antifongique de première ligne pour le traitement des trichosporonoses invasives selon l'ESCMID et l'ECMM (7) (41). Il présente une bonne activité *in vitro* sur la plupart des isolats de *Trichosporon* spp. et a été associé à une bonne efficacité clinique (71). Quelques cas de la littérature relatent une résistance *in vitro* et clinique au voriconazole (72).

Le fluconazole n'est pas la molécule de première intention dans les trichosporonoses. Dans l'étude de Shin-Huei Kuo *et al.*, des CMI élevées (≥ 8 μ g/ml) ont été rapportées au fluconazole pour 70,2 % des isolats de *T. asahii* (n = 59/84) et 16,1 % des isolats de *Trichosporon* non-*asahii* (n = 5/31) (52). De plus, il semble que l'incidence de cette résistance soit en augmentation. Plusieurs études récentes relatent des CMI élevées au fluconazole chez *Trichosporon* spp., et plus particulièrement pour *T. asahii* (52), résistance qui n'étaient pas fréquemment observées au cours d'études plus anciennes.

L'association de l'amphotéricine B à un triazolé n'est pas plus efficace que la monothérapie par voriconazole (37). L'association antifongique est donc à réserver aux traitements des infections réfractaires (7).

Selon les recommandations de l'ECMM et de l'ISHAM, le posaconazole peut également être utilisé en traitement de première intention en cas de préexposition au voriconazole. L'isavuconazole semble être une bonne alternative, mais n'est pas recommandé en raison du manque de données cliniques (7).

La durée recommandée de traitement est de deux semaines à partir de la première hémoculture négative en cas de fongémie et en l'absence de foyers profonds.

Si le patient présente une atteinte d'organe, le traitement doit être poursuivi 4 à 6 semaines, ou jusqu'à normalisation du bilan d'imagerie. La durée du traitement doit être individualisée et peut être prolongée en fonction des cas (Figure 20).

Outre le traitement antifongique, il convient de prendre en charge la porte d'entrée. Une diminution de l'immunosuppression et un retrait des dispositifs intravasculaires est à envisager afin de contrôler la source de l'infection. Une ablation chirurgicale des foyers infectieux peut également être proposée (Figure 20).

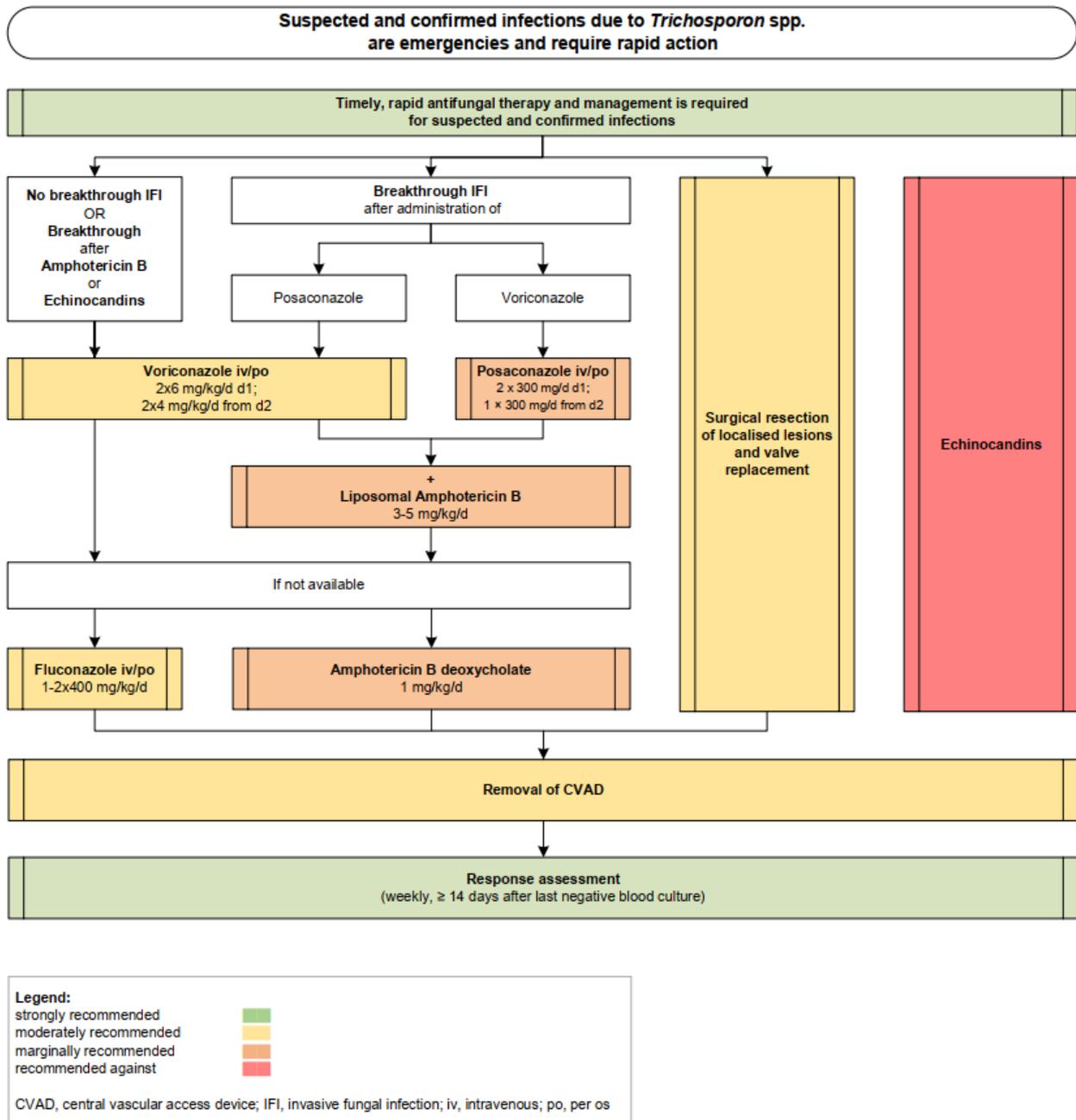


Figure 20 : Recommandations 2021 de l'ECMM en coopération avec l'ISHAM et l'ASM pour le traitement antifongique et la prise en charge des patients atteints d'infections invasives à *Trichosporon* spp. (7)

Différentes études ont décrit un taux de mortalité globale de 53 à 80 % dans les cas d'IFI à *Trichosporon* spp. Haitao Li *et al.* ont réalisé une revue de la littérature portant sur la mortalité de 140 cas d'infections à *T. asahii*.

En comparaison aux autres IFI, la fongémie à *T. asahii* était associée au taux de mortalité global le plus élevé (51,5 %), dont 30,3 % était directement imputable à l'infection par *T. asahii* (37) (Figure 21).

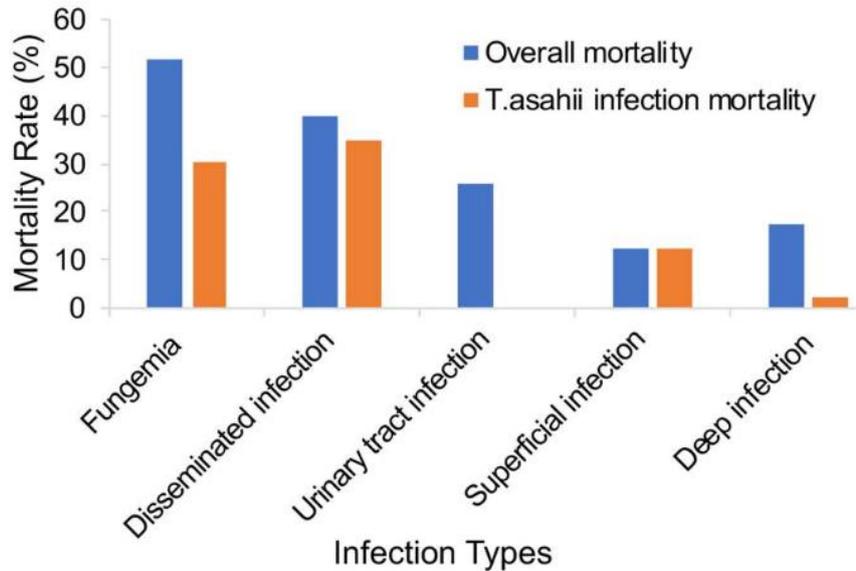


Figure 21 : Taux de mortalité associé à *T. asahii* au cours de différents types d'infections (37).

Ces données sont cohérentes avec celles de Yong Liao *et al.*, qui ont analysé 185 cas de fongémies à *Trichosporon* spp. Ils rapportent également un taux de mortalité globale de 90 % (9 décès sur 10 patients) chez les patients n'ayant pas reçu un traitement approprié (73).

Le diagnostic et le traitement approprié de la trichosporonose invasive apparaissent donc comme cruciaux pour le pronostic vital du patient.

b. *Rhodotorula* spp.

Les différentes espèces de *Rhodotorula* présentent des CMI élevées à la majorité des molécules azolés. Ces CMI sont supérieures aux *breakpoints* de *C. albicans* ou ceux d'*A. fumigatus* (41). Pour cette raison, les espèces de *Rhodotorula* sont considérées comme intrinsèquement résistantes à la plupart azolés, en plus de la résistance naturelle aux échinocandines (74). Ces résistances *in vitro* sont également cohérentes avec les nombreux cas d'IFI à *Rhodotorula* spp. survenants au cours d'une préexposition par du fluconazole ou de la caspofungine. Bien que certaines études aient démontré des CMI basses pour certains azolés comme le kétoconazole (75), il n'existe pas assez de données à l'heure actuelle sur l'éventuelle efficacité *in vivo* des molécules azolés (41).

Les CMI de *Rhodotorula* spp. pour l'amphotéricine B (< 1 mg/l) et la flucytosine (< 0,5 mg/l) sont basses (7). Par conséquent, le traitement de première intention des IFI à *Rhodotorula* spp. est l'amphotéricine B, et plus précisément l'amphotéricine B liposomale afin de diminuer le risque de néphrotoxicité. Elle peut éventuellement être associée à la 5-flucytosine (Figure 22). Même si aucune résistance *in vivo* et *in vitro* n'a été citée dans la littérature, il a été démontré qu'une exposition *in vitro* prolongée (> 65 jours) à des concentrations croissantes d'amphotéricine B entraînait une augmentation des résistances de souches de *Rhodotorula* spp. initialement sensibles (76).

La durée du traitement des fongémies à *Rhodotorula* spp. est de deux à trois semaines après la première hémoculture négative, en l'absence de foyers profonds.

En cas d'atteinte d'organe, le traitement doit être prolongé selon la réponse clinique. Les sociétés expertes recommandent un traitement de 6 à 8 semaines pour une endocardite, voir jusqu'à un an en cas d'infection sur valve prothétique (7).

L'ablation chirurgicale des foyers infectieux, comme le remplacement de valve, a prouvé son efficacité dans les IFI à *Rhodotorula* spp. Le retrait des dispositifs médicaux intravasculaires, ou de dialyse, est nécessaire afin de contrôler la source de l'infection. Bien que la neutropénie soit un facteur de risque prouvé des IFI à *Rhodotorula* spp, l'utilisation de facteurs de croissance des granulocytes est peu documentée quant à son efficacité (7).

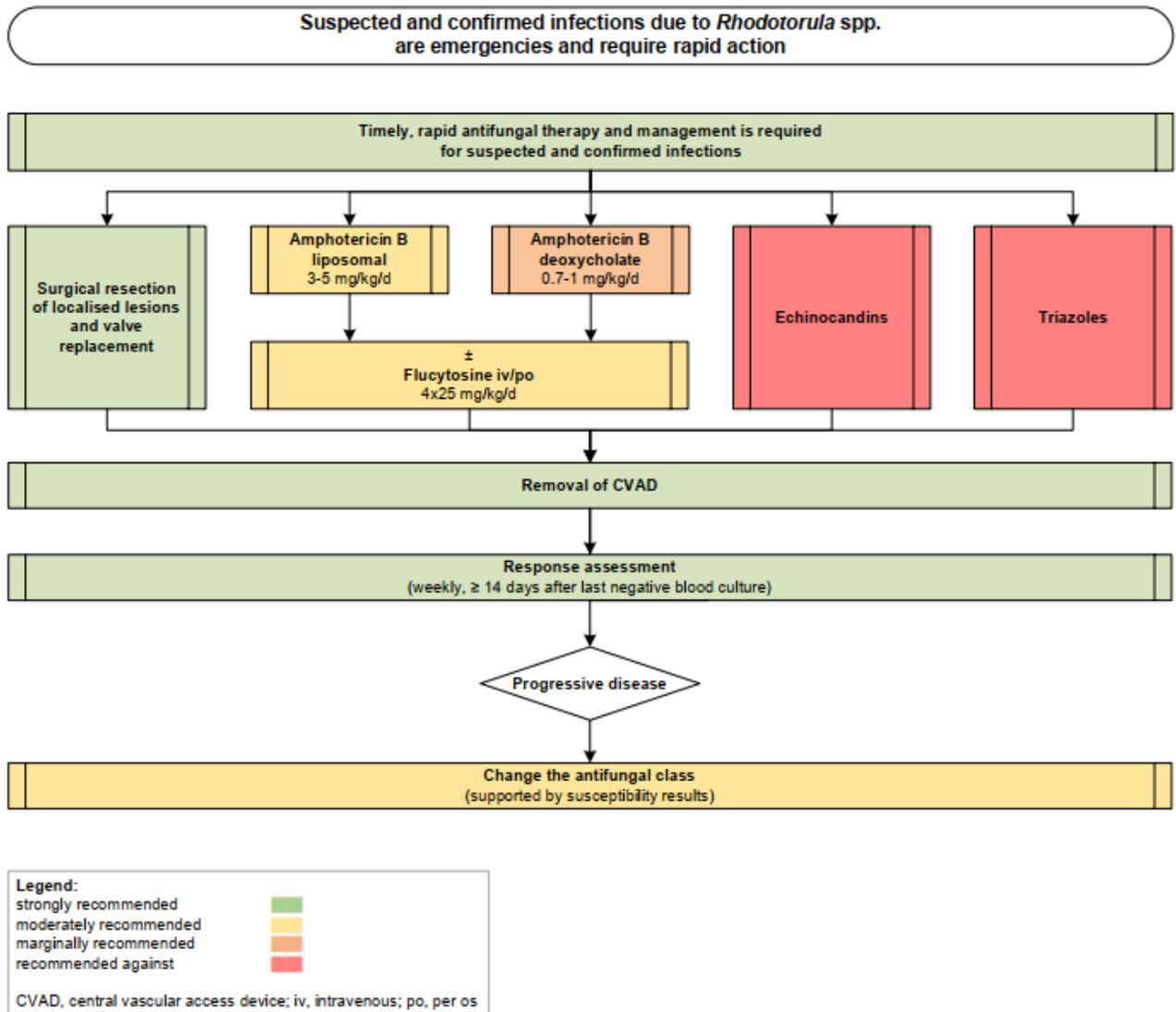


Figure 22 : Recommandations 2021 de l’ECMM en coopération avec l’ISHAM et l’ASM pour le traitement antifongique et la prise en charge des patients atteints d’infections invasives à *Rhodotorula* spp. (7).

La mortalité des IFI à *Rhodotorula* spp. est comprise entre 15 et 42 % selon les études (7).

La prise en charge de la porte d’entrée est un facteur clé de la survie des patients. En effet, l’étude de Potenza L. *et al.* a démontré un taux de mortalité de 50 % (n = 4/8) chez les patients dont le CVC n’avait pas été retiré, contre 19 % (n = 3/16) chez les patients ayant eu une ablation du CVC (77).

Tableau 5 : Synthèse des activités *in vitro* des molécules antifongiques sur les levures du genre *Trichosporon* et *Rhodotorula* (7) (41) (78).

	Polyènes	Fluco	5FC	Vorico	Posaco	Isavuco	Candines
Trichosporon spp.	+/-	+/-	-	+	+	+	-
Rhodotorula spp.	+	-	+	-	-	-	-

Vert = sensible, jaune = sensibilité variable, rouge = résistante. Fluco = fluconazole, 5FC = 5-fluorocytosine, Vorico = voriconazole, Posaco = posaconazole, Isavuco = isavuconazole, candines = échinocandines

Tableau 6 : Traitement antifongique systémique recommandé et autres prises en charge chez les adultes atteints d'infections à *Trichosporon* spp. et *Rhodotorula* spp. selon l'ECMM/ISHAM (7)

	Traitement de première intention	Alternative au traitement de première intention	Traitement de seconde intention	Traitement à éviter car inefficace	Retrait du cathéter central
Trichosporon spp.	Voriconazole (ou posaconazole)	Fluconazole	Amphotéricine B liposomale ou désoxycholate	Échinocandines	Oui
Rhodotorula spp.	Amphotéricine B liposomale	Amphotéricine B désoxycholate +/- flucytosine	Changer de classe d'antifongique selon le résultat de l'ATFg	Triazolés et échinocandines	Oui

2. Interprétation de l'antifongigramme

Actuellement, il n'existe pas de seuils cliniques (CBP, *clinical breakpoint*) spécifiques pour les genres *Rhodotorula* et *Trichosporon*. Cependant, l'organisme CLSI (*Global Laboratory Standards for a Healthier World*) a publié en 2022 des seuils épidémiologiques (ECV) pour les basidiomycètes. Ces seuils permettent de classer un isolat en « sauvage » ou « non sauvage », c'est-à-dire ne présentant pas un phénotype de sensibilité habituel (Tableau 7). Contrairement aux CBP, les ECV ne classent pas les isolats comme sensibles ou résistants. Néanmoins les seuils épidémiologiques sont utiles pour :

- Permettre de reconnaître les phénotypes les plus courants,

- Permettre d'évaluer la fiabilité de la méthode utilisée pour établir l'antifongigramme. (7)

L'ECV définit la limite supérieure de sensibilité pour la population d'isolats de type sauvage.

Tableau 7 : Valeurs seuils épidémiologiques pour les tests de sensibilité *in vitro* de *T. asahii* et *R. mucilaginosa*

D'après la quatrième édition (2022) du rapport M57S du CLSI (79)

Molécule antifongique	Espèce fongique	ECV, µg/mL
Amphotéricine B	<i>R. mucilaginosa</i>	2
	<i>T. asahii</i>	1
Fluconazole	<i>T. asahii</i>	8
Itraconazole	<i>R. mucilaginosa</i>	4
	<i>T. asahii</i>	1
Posaconazole	<i>R. mucilaginosa</i>	4
	<i>T. asahii</i>	1
Voriconazole	<i>R. mucilaginosa</i>	16

Concernant les levures du genre *Trichosporon*, le traitement de première intention par voriconazole doit être instauré sans attendre le résultat de l'antifongigramme. Néanmoins, il est préférable d'évaluer les sensibilités aux antifongiques afin de surveiller l'émergence de mutants résistants à des fins épidémiologiques. Peu de méthodes commerciales ont été testées pour cela, il faut donc privilégier l'utilisation des méthodes de microdilution EUCAST ou CLSI afin d'obtenir des résultats fiables (7).

Il est possible de déterminer les sensibilités de *Rhodotorula* spp. aux antifongiques par les méthodes de référence, mais également par la méthode Sensititre™ (Thermo Scientific) qui a montré de bons résultats. La détermination des CMI de *Rhodotorula* spp. permet d'orienter le traitement de seconde intention en cas d'échec thérapeutique (Figure 22) et de réaliser une surveillance épidémiologique (7).

II. La PCR en temps réel : un outil d'avenir pour le diagnostic d'infections fongiques invasives rares ?

A. Généralités et principes de la PCR en temps réel TaqMan®

1. La réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La réaction de polymérisation en chaîne (PCR) est une méthode de biologie moléculaire permettant d'amplifier un grand nombre de fragments d'ADN. Le principe de la PCR repose sur la capacité de l'ADN polymérase thermophile à générer un brin complémentaire d'une séquence d'ADN utilisée comme matrice.

Pour cela, il est nécessaire d'utiliser deux amorces (ou *primers*) qui sont complémentaires des extrémités 3' des brins sens et anti-sens d'une séquence d'ADN cible à amplifier (ou amplicon).

L'ADN polymérase peut ainsi se lier aux amorces hybridées à l'ADN et intégrer des désoxyribonucléotides (dNTP) préalablement introduits dans le mélange réactionnel. L'intégration des dNTP aboutit à la synthèse d'un brin complémentaire nécessaire à la formation d'un double brin d'ADN (80).

La PCR correspond à une répétition de cycles de trois étapes à des températures différentes par l'intermédiaire d'un thermocycleur (Figure 23) :

1. Étape de dénaturation : l'ADN est soumis à une température de 95°C afin de dissocier les liaisons hydrogènes entre les paires de bases complémentaires de l'ADN double brin. Les deux brins complémentaires sont donc déshybridés.

2. Étape d'hybridation (*annealing*) : les amorces sens et anti-sens vont s'hybrider à l'ADN matrice simple brin à une température préalablement identifiée qui leur est thermodynamiquement favorable. La température d'hybridation est généralement comprise entre 50 et 68°C selon les amorces.

3. Étape d'élongation : l'ADN polymérase synthétise le brin complémentaire de l'ADN matrice en intégrant les dNTP dans le sens 5'-3'. La durée et la température de cette étape dépendent de la longueur de l'amplicon et de l'ADN polymérase thermorésistante utilisée (en général de 72°C) (80).

L'ensemble de ces étapes correspond à un cycle de PCR. Le nombre de cycles de PCR peut être adapté en fonction de la cible génomique.

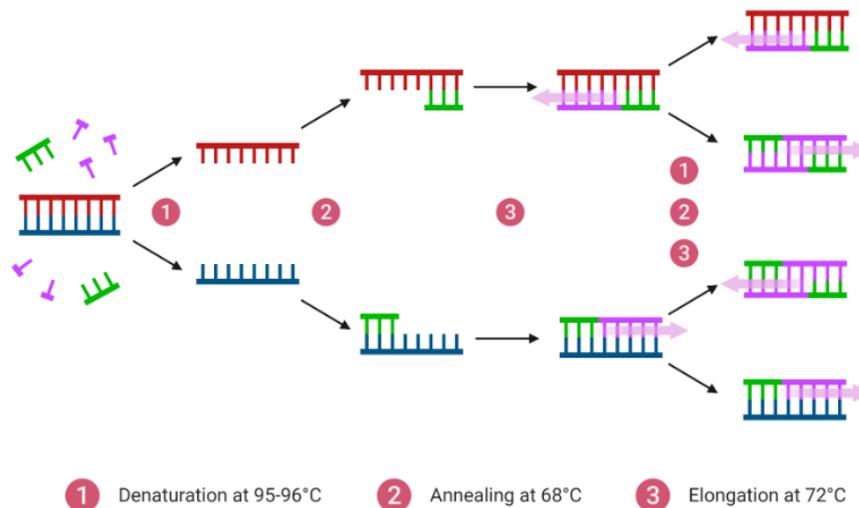


Figure 23 : Les différentes étapes constituant un cycle de PCR

Source : BioRender (2019)

L'ADN est amplifié exponentiellement, à chaque cycle la quantité d'ADN est théoriquement doublée. Par conséquent, pour n cycles, le nombre de copies d'ADN obtenues équivaut à 2^n . Afin d'obtenir un facteur d'amplification de 2, il faut que l'efficacité de la PCR soit de 100 %.

Au début de la réaction de PCR, le facteur d'amplification est faible en raison de la faible probabilité que l'ADN matrice, présent en faible quantité, entre en contact avec les amorces et l'ADN polymérase. Cette probabilité augmente au fur et à mesure que la quantité L'ADN cible croît à mesure que les cycles d'amplification se succèdent, c'est la phase exponentielle. Elle est modélisable par la formule suivante :

$$N_c = N_0 \times (1 + E)^c$$

avec N_0 = nombre initial de copies, N_c = nombre de copies au cycle c , et E = efficacité de la PCR. Si E est de 100 % à chaque cycle, le nombre de copies doublera :

$$N_c = N_0 \times 2^c$$

L'amplification diminue à nouveau vers la fin de la réaction de PCR en raison de l'épuisement des réactifs, correspondant à une phase de plateau (81) (Figure 24).

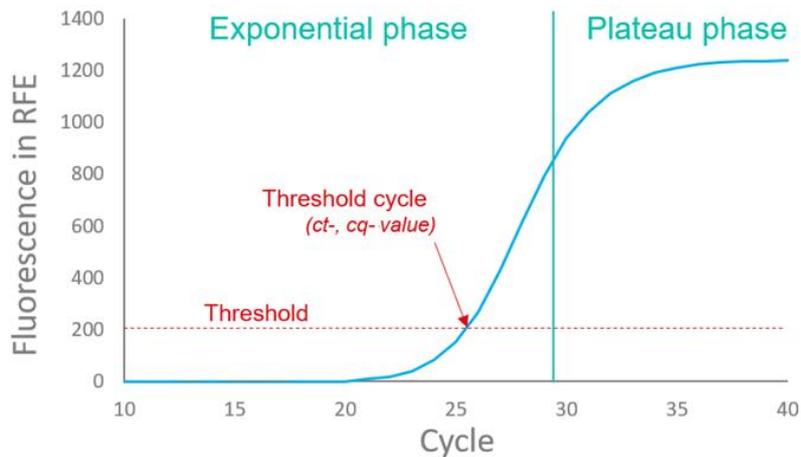


Figure 24 : Exemple de courbe de qPCR représentant les différentes phases d'amplification (82)

La valeur seuil Ct ou Cq (*cycle threshold/quantification cycle*) est calculée automatiquement par le logiciel du thermocycleur. La réaction de PCR est considérée positive lorsque l'intensité de fluorescence dépasse le seuil défini (threshold). Le Cq est inversement proportionnel au logarithme décimal de la quantité d'ADN initiale. Ainsi, plus la quantité d'ADN cible initiale est élevée plus le Cq est faible.

Il existe plusieurs méthodes de PCR, les trois grandes catégories sont :

La PCR numérique : elle permet une quantification absolue grâce à la loi de Poisson, ne nécessitant pas l'utilisation de courbes étalons,

La PCR classique (ou en point final) : elle mesure la quantité de produits de PCR accumulée à la fin des cycles après migration sur gel d'agarose,

La PCR en temps réel, aussi appelée PCR quantitative (qPCR) : à chaque cycle d'amplification, la quantité d'amplicon est mesurée par l'intermédiaire d'un marqueur fluorescent. Une fois que la quantité d'ADN dépasse le seuil de détection, une valeur de cycle de PCR (Cq) est obtenue. Ce cycle seuil permet éventuellement de quantifier la quantité initiale d'ADN présente dans l'échantillon à partir d'une gamme étalon (83).

2. La PCR en temps réel ou qPCR

Afin de détecter en temps réel les produits amplifiés, la qPCR utilise un marqueur fluorescent (ou fluorophore). Les différents types de fluorophores sont classés en deux catégories principales : les agents intercalants et les sondes fluorescentes spécifiques.

a. Les agents intercalants (et apparentés)

Par définition, un agent intercalant est une molécule pouvant s'insérer entre les brins d'ADN formés par les bases appariées des acides nucléiques. Le bromure d'éthidium est un agent intercalant, il devient fluorescent lorsqu'il est exposé à des rayonnements ultraviolets. Du fait de son effet mutagène important, il n'est plus utilisé en laboratoire de biologie médicale, et a été remplacé par le SYBR® Green.

Le SYBR® Green n'est pas *stricto sensu* un agent intercalant puisqu'il se lie au petit sillon de l'ADN. À chaque étape d'hybridation et d'élongation d'un cycle, la molécule de SYBR® Green s'insère entre les bases nucléotidiques de l'ADN double brin néoformé. Une fois excitée par des rayonnements ultraviolets, elle émet un signal de fluorescence (Figure 25). La mesure de l'intensité du signal, à la fin de chaque étape d'élongation, permet de suivre la progression cycle par cycle de la réaction de PCR.

Ce système présente l'avantage d'être sensible, et moins coûteux puisqu'il s'affranchit de l'utilisation d'une sonde. Le principal inconvénient de cette technique est sa spécificité puisqu'elle peut générer de faux signaux positifs. Le SYBR® Green se lie à n'importe quel ADN double brin, il peut ainsi se lier à d'autres séquences que celle initialement ciblée. Les amorces sont donc déterminantes pour la spécificité de la réaction et doivent être parfaitement étudiées au préalable.

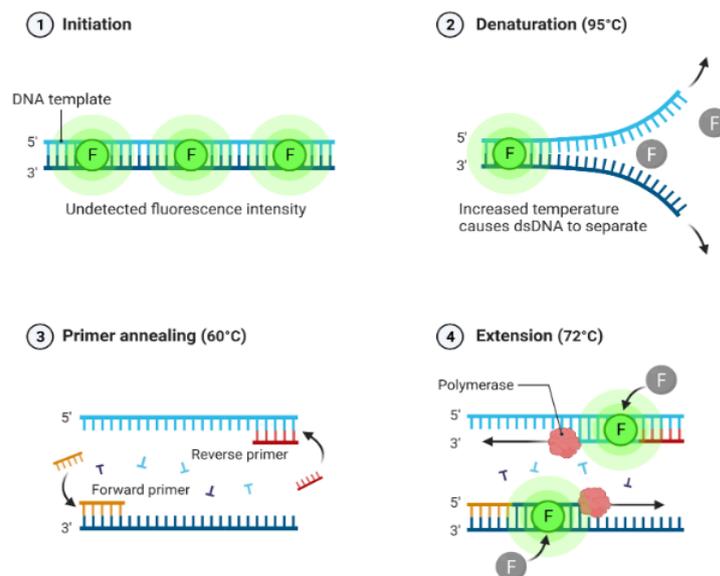


Figure 25 : Principe de la méthode SYBR® Green.

Source : BioRender (2022)

b. Les sondes fluorescentes

Il existe de nombreux types de sondes fluorescentes :

- Les sondes d'hydrolyse (TaqMan[®]),
- Les balises moléculaires,
- Les sondes d'hybridation double (FRET),
- Les sondes Scorpions[®],
- Les sondes Eclipse.

À l'heure actuelle, les sondes d'hydrolyse sont les plus utilisées, suivies des sondes d'hybridation double (80) (84).

L'étymologie du mot "TaqMan" provient de deux entités : la Taq polymérase, une ADN polymérase thermostable isolée à partir de *Thermus aquaticus*, une bactérie extrêmophile, et de Pac-Man. En effet, la Taq polymérase possède une activité exonucléase 5'-3' permettant de dégrader des oligonucléotides.

Les sondes TaqMan[®] sont marquées par un fluorophore de manière covalente en 5' et un désactivateur (*quencher*) à l'extrémité 3'. Le désactivateur inhibe la fluorescence émise par le fluorophore, tant qu'ils restent proches l'un de l'autre.

Chaque sonde TaqMan[®] est conçue pour s'hybrider spécifiquement à une région de l'ADN cible. Lors de l'élongation de l'amorce par la Taq polymérase, l'activité exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase hydrolyse la sonde hybridée au brin matrice. L'hydrolyse de la sonde libère le fluorophore, rompant ainsi sa proximité avec le désactivateur et permettant l'émission de la fluorescence (Figure 26).

Par conséquent, la fluorescence détectée est proportionnelle à la quantité de fluorophore libérée, et donc à celle de l'ADN cible dans l'échantillon.

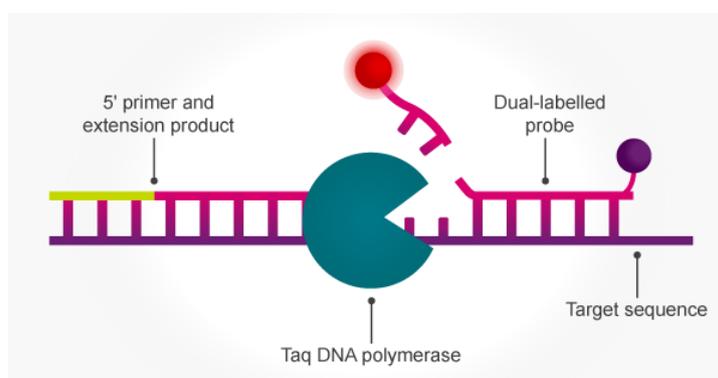


Figure 26 : Représentation simplifiée du principe de la sonde TaqMan[®] (85)

Cette technologie présente l'avantage d'être très sensible et spécifique grâce à la complémentarité de la sonde. Elle rend également possible le multiplexage permettant la détection de plusieurs fluorophores, et donc de plusieurs cibles au sein d'un même échantillon.

3. Apport actuel de la PCR dans le diagnostic de rhodotoruloses et trichosporonoses invasives.

L'apport de la biologie moléculaire dans les infections à *Rhodotorula* spp. a été très peu étudié. Aucune technique de biologie moléculaire spécifique de *Rhodotorula* spp. utilisable sur échantillon clinique n'a été rapportée dans la littérature.

Seul le test PCR multiplex syndromique cobas® eplex *Blood Culture Identification Fungal Pathogen Panel* (BCID-FP) permet la détection de *Rhodotorula* spp. directement à partir d'un flacon d'hémoculture positif.

Néanmoins, certaines réactions faussement positives à *Rhodotorula* spp. ont été décrites. Ces tests positifs n'ont pas été confirmés par culture, ces erreurs survenant lors d'une co-détection avec une levure du genre *Candida*. Une possible réaction croisée avec les levures du genre *Candida* a rapidement été écartée.

L'hypothèse d'une contamination par l'environnement de *Rhodotorula* spp. a été évoquée, que ce soit dans le milieu de l'hémoculture, au moment de la réalisation du test, ou dans les cartouches de test (86).

De rares outils de biologie moléculaire ont été développés pour le diagnostic de trichosporonose.

Des PCRs dites « nichées » ont été développées et testées sur tissus fixés au formol et paraffinés (87), et sur sérum (88–90). Les résultats de PCRs nichées sur sérum sont très encourageants du fait de la détection sur une période plus précoce et étendue que l'hémoculture des levures du genre *Trichosporon*.

Plus récemment, une qPCR Taqman® spécifique de l'espèce *T. asahii* a été développée sur la région *IGS1* et utilisée sur sérum de patients (91,92). Cette qPCR présente une très bonne spécificité en comparaison à l'antigène GXM sérique, ainsi qu'une détection plus précoce que l'hémoculture. L'ADN du champignon a été détecté dans le sérum environ 2 semaines avant la positivité de l'hémoculture chez un patient greffé (92). De plus, l'approche quantitative permettrait de suivre l'efficacité du traitement des trichosporonoses invasives.

B. Objectifs du travail

Les IFI à *Rhodotorula* spp. et *Trichosporon* spp. sont un véritable défi diagnostique et thérapeutique en raison de la pauvreté des outils diagnostiques actuels et de leur résistance naturelle aux échinocandines.

La qPCR est une méthode d'analyse de choix : sensible, spécifique et automatisable. Son utilisation est de plus en plus courante dans les laboratoires de biologie médicale. L'absence de marqueurs antigéniques et de tests spécifiques de biologie moléculaire nous ont amené à développer deux qPCR spécifiques des genres *Trichosporon* et *Rhodotorula*. Ces outils pourront être utilisés sur des matrices normalement stériles, comme du sang total ou des biopsies, afin d'améliorer le diagnostic de ces IFI.

III. Matériels et méthodes

A. Développement *in silico* d'amorces et sondes TaqMan®

1. Élaboration des amorces et sondes

Les gènes ribosomiques sont présents en de nombreuses copies en tandem au sein du génome fongique. Ces gènes sont donc des cibles majeures pour la détection par biologie moléculaire des champignons.

Les régions codantes pour les ARN ribosomiques (ARNr), 18S (ou petite sous-unité de l'ARNr), 5,8S et 28S (ou grande sous-unité de l'ARNr) sont très conservées, mais présentent peu de variabilité interspèces pour les genres *Trichosporon* et *Rhodotorula*. Cependant, les régions *ITS1* et *ITS2*, les deux domaines hypervariables *D1/D2* de l'ARNr 28S, ainsi que les régions *IGS* présentent une forte variabilité. De plus, les régions *IGS* présentent l'avantage d'être de grande taille (93) (Figure 27).

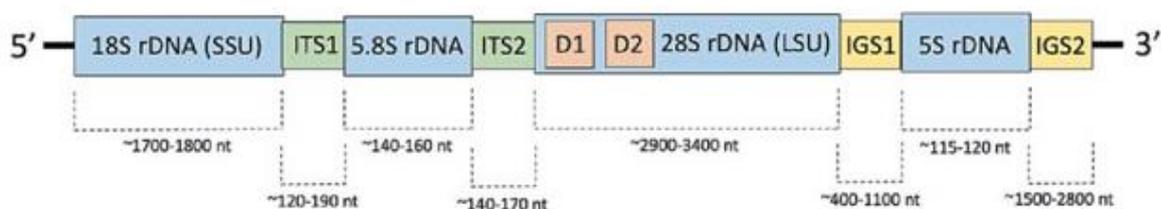


Figure 27 : Représentation graphique de l'organisation du gène de l'ARN ribosomique.

Les longueurs des fragments d'ADN ont été obtenues à partir de l'analyse des enregistrements fongiques NCBI GenBank. Adapté de White et al., 1990. (94)

La conception des amorces sens (*forward*), anti-sens (*reverse*) et des sondes (*probe*) sur les régions à partir du 18S jusqu'à l'*IGS* a été réalisée à partir du logiciel Geneious Prime version 2023.2. Afin de respecter les normes de conceptualisation, les caractéristiques principales suivantes des amorces et sondes ont été recherchées à partir du logiciel Geneious Prime :

- le T_m (température d'hybridation),
- la présence de structures secondaires, telles que des *hairpins* (épingles à cheveux) ou d'autodimères,
- le pourcentage de guanine (G) - cytosine (C).

Pour la conception d'amorces et de sondes spécifiques des genres *Trichosporon* spp. et *Rhodotorula* spp., les séquences génomiques (Figure 27) de

différentes espèces ont été extraites à partir de la base de données GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov>) et alignées à l'aide du logiciel Geneious Prime version v2023.2. Chaque espèce a été alignée en double à partir d'un numéro GenBank différent, afin de s'assurer de l'homogénéité et de la fiabilité des séquences génomiques (Annexe 1 et 2). Du fait de la diversité génétique de la région *IGS1* du genre *Trichosporon*, un alignement avec les autres genres fongiques n'a pu être réalisé (Tableau 8 et Annexe 3).

Tableau 8 : Séquences génomiques de différentes espèces fongiques utilisées pour la conception des amorces et sondes spécifiques des genres *Trichosporon* et *Rhodotorula*.

Espèces fongiques	N° d'identification GenBank® pour les régions 5,8S et ITS	N° d'identification GenBank® pour les régions IGS1	N° d'identification GenBank® pour les régions 28S (syn 26S)
<i>Candida albicans</i>	HE860438, HE860439		CAU45776, KJ624063
<i>Candida glabrata</i>	HE993756, HE993757		CGU44808, HM591724
<i>Malassezia pachydermatis</i>	KY104148, KY104149		DQ915500, DQ915501
<i>Cryptococcus neoformans</i>	MT233283, GQ850145		AF189845
<i>Cryptococcus gattii</i>	OR196128, JN939487		KX792972
<i>Trichosporon ovoides</i>	OP598048, KY105752	KT936598, JX124986	AF075523, AB189942
<i>Trichosporon asahii</i>	KY105710, KY105711	ON051589, ON051590	AF105393, AB186490
<i>Trichosporon inkin</i>	KY105737, KY105738	OM472498, OM472499	AB492266, AF105396
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	KU729065, KU729022		AF444749, AF444750

Les amorces et les sondes ont été élaborées *in silico* en respectant les règles de conception de qPCR disponibles dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Cahier des charges suivi pour la conception des amorces et sondes (95–97)

Amorces	Sondes
Amplicon entre 50 et 130 paires de bases (pb), idéalement < 80 pb	
Longueur entre 15-30 nucléotides	
Contient entre 30 et 80 % de guanine (G) et de cytosine (C)	
Éviter les séquences avec une répétition ≥ 4 nucléotides (en particulier de G)	
Tm entre 50 et 65°C	
Écart entre les Tm des deux amorces < 2°C	Tm > 7-10°C par rapport au Tm des amorces
Éviter la formation de <i>hairpin</i> ΔG (changement d'énergie libre) > -3.0 kcal.mol ⁻¹	
Éviter la formation de dimères d'amorces ΔG d'autodimères et d'hétérodimères > -5.0 kcal.mol ⁻¹	
Éviter d'avoir plus de 2 G ou C dans les 5 dernières pb à l'extrémité 3'	Éviter une guanine à l'extrémité 5'

Les amorces et sondes sont une combinaison d'adénine (A), cytosine (C), guanine (G) et thymine (T). L'utilisation d'un nucléotide dit « dégénéré » est possible lorsqu'un nucléotide est différent des séquences d'une espèce cible à une autre, et qu'il est souhaitable de concevoir des amorces et sondes capables de s'hybrider à ces différentes espèces. En réalité, un tube contenant des amorces ou des sondes avec des nucléotides dégénérés contient un mélange équimolaire de plusieurs séquences, chacune contenant les différents nucléotides cibles. Ces nucléotides sont identifiables grâce à une nomenclature internationale disponible sur le site <http://www.alphadna.com/fuseful.html>.

Afin d'étudier les régions les plus optimales pour chaque genre fongique, les amorces et sondes ont été conçues en deux temps sur :

1. Les régions 5,8S et ITS,
2. Les régions 28S et IGS1.

Les fluorophores (FAM) et (VIC) ont été sélectionnés selon les canaux de détection disponibles sur le thermocycleur QuantStudio™ 5 Real-Time PCR (Applied Biosystems™).

Les *quencher* BHQ-1 (*Black Hole Quencher 1*) ont été sélectionnés en fonction des longueurs d'onde des fluorophores FAM et VIC (Tableau 10).

Les sondes MGB (*Minor Groove Binder*) ou liant au sillon mineur, intègrent un *quencher* non fluorescent à leur extrémité 3' (NFQ). Le fragment liant le petit sillon (MGB) augmente le T_m de la sonde, permettant la conception de sondes plus courtes. Les sondes de type MGB ont été utilisées pour les régions 28S et *IGS1* (Tableau 11).

Tableau 10 : Séquences des amorces et sondes élaborées sur les régions 5,8S et ITS

Nom du mélange réactionnel	Nom des amorces et sondes	Séquence (5'-3')	Région cible	Taille (pb)	Tm (°C)	Longueur d'amplicon (pb)	Espèces d'intérêt ciblées
Tri1 ITS	<i>Trichosporon_F1</i>	GATTGGATTTGGGCGTCT	<i>ITS2</i>	18	55	88	<i>T. asahii</i>
	<i>Trichosporon_R1</i>	GTGAAACTTATTACACCAGACAT	<i>ITS2</i>	23	54,7		<i>T. inkin</i>
	<i>Trichosporon_P1 (FAM)</i>	CGCCTTAAAAGAGTTAGCAAGTTTGACA	<i>ITS2</i>	28	62,7		<i>T. faecale</i>
Tri2 ITS	<i>Trichosporon_F2</i>	ACAATGTGTAATGAACGTCGT	<i>ITS1</i>	21	56,2	88	<i>T. asteroides</i>
	Fong_R2	GCTGCGTTCTTCATCGAT	5,8S	18	55,6		<i>T. japonicum</i>
	Fong_P2 (FAM)	ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT	5,8S	25	62,9		<i>T. ovoides</i>
Rho1 ITS	<i>Rhodotorula_F1</i>	AGTCCGAACTCTCACTTTC	<i>ITS1</i>	19	54,2	91	<i>R. mucilaginosa</i> <i>R. glutinis</i>
	<i>Rhodotorula_R1</i>	TTTAATACATTCATAGACTTTGTGTT	<i>ITS1</i>	26	54		
	<i>Rhodotorula_P1 (VIC)</i>	CACTTGTTTGGGATAGTAACTCTCGC	<i>ITS1</i>	26	61,8		
Rho2 ITS	<i>Rhodotorula_F2</i>	CTTATAAACACAAAGTCTATGAATGT	<i>ITS1</i>	26	54,2	97	
	Fong_R2	GCTGCGTTCTTCATCGAT	5,8S	18	55,6		
	Fong_P2 (FAM)	ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT	5,8S	25	62,9		
Rho3 ITS	Fong_F3	GTGAATCATCGAATCTTTGAACG	5,8S	23	56,6	96	
	<i>Rhodotorula_R3</i>	AGAAAGAGGAGGGTTGAAGTA	<i>ITS2</i>	21	55,6		
	<i>Rhodotorula_P3 (VIC)</i>	CCGTGGAGCATGCCTGTTTGAG	5,8S	22	64,2		

F = amorce sens, R = amorce anti-sens et P = sonde. Une amorce anti-sens et une sonde panfongiques (en bleu), communes à deux qPCR, ont été utilisées afin de réduire les coûts des réactifs. La spécificité de ces qPCR est assurée par l'amorce sens.

Tableau 11 : Séquences des amorces et sondes élaborées sur les régions 28S et *IGS1*

Nom du mélange réactionnel	Nom des amorces et sondes	Séquence (5'-3')	Région cible	Taille (pb)	Tm (°C)	Longueur d'amplicon (pb)	Espèces d'intérêt ciblées
Tri1 IGS	<i>TriIGS_F1</i>	TGTAAGCAGTAGAGTAGCCTTGT	<i>IGS1</i>	23	58,9	89	<i>T. asahii</i> <i>T. inkin</i> <i>T. faecale</i>
	<i>TriIGS_R1</i>	CCAADCATAGAGAGTCCAAAAGGA	<i>IGS1</i>	24	58		
	<i>TriIGS_P1</i> (FAM)	AGGCTCAGCTYTTGTTCTACAG-MGB	<i>IGS1</i>	23	59,9		
Tri2 IGS	<i>TriIGS_F2</i>	TGTAAGCAGTAGAGTAGCCTTGTG GTCGCCCCCAGTCCAT	<i>IGS1</i>	25	60,6	107	<i>T. asteroides</i> <i>T. japonicum</i> <i>T. ovoides</i>
	<i>TriIGS_R2</i>	TTGTTCTACAGATTTGTCCTTTTGG-	<i>IGS1</i>	17	61,1		
	<i>TriIGS_P2</i> (FAM)	MGB	<i>IGS1</i>	25	58		
T.asa3 IGS	<i>TasaIGS_F3</i>	TGAGGTCTCGATGTGAAGTCA	<i>IGS1</i>	21	58,5	138	<i>T. asahii</i>
	<i>TasaIGS_R3</i>	CTCTTGGAAGGACACACTAG	<i>IGS1</i>	22	58,1		
	<i>TasaIGS_P3</i> (VIC)	TGCAAAGACCAAGTATGAGTGC-MGB	<i>IGS1</i>	22	59,2		
Rho1 28S	<i>Rho28S_F1</i>	AGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTGT	28S	26	58,8	128	<i>R. mucilaginosa</i> <i>R. glutinis</i>
	<i>Rho28S_R1</i>	AACTGCTACCTTCTCTACCAT	28S	23	58,4		
	<i>Rho28S_P1</i> (FAM)	AATCGGTTTGCAGGCCAG-MGB	28S	18	58,3		
Rho2 28s	<i>Rho28S_F2</i>	CAGCATCAGTTTTCCGGGAT	28S	20	58,2	92	<i>R. mucilaginosa</i> <i>R. glutinis</i>
	<i>Rho28S_R2</i>	CAGTCCCCAAGATGTATCCA	28S	21	58,9		
	<i>Rho28S_P2</i> (FAM)	AGAGAGAAGGTAGCAGTTTCCGG-MGB	28S	22	59,5		

Les nucléotides dégénérés ont été identifiés en rouge.

2. Détermination informatique de la qualité des amorces et sondes

Le ΔG (variation d'énergie libre de Gibbs) est une unité de mesure utilisée afin de déterminer la probabilité de formation d'un dimère ou d'un *hairpin* (épingle à cheveux) de sondes ou d'amorces (Figure 28). Le ΔG est l'énergie nécessaire pour briser la structure secondaire. Des valeurs très négatives de ΔG indiquent un plus grand nombre d'appariement de bases, pouvant aboutir à ces structures secondaires.

La détermination du ΔG de structures secondaires (*hairpins*, autodimères et hétérodimères) a été réalisée avec le logiciel *OligoAnalyzer Tool* de IDT (Integrated DNA Technologies, <https://eu.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Les résultats sont présentés en Annexe 4 et 5.

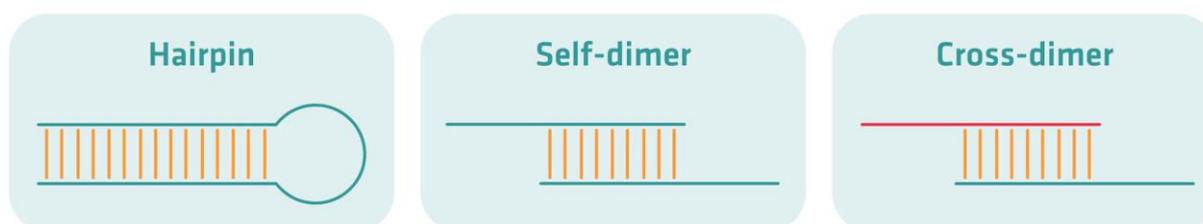


Figure 28 : Représentation graphique de la formation de structures secondaires (96)

L'absence de réactions croisées avec l'ADN humain et d'autres espèces fongiques, ainsi que la mise en évidence des genres fongiques ciblés par les amorces et sondes élaborées, ont été vérifiées sur le logiciel *Primer Designing Tool* de NCBI (*National Center for Biotechnology Information*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>).

B. Extraction de l'ADN d'isolats fongiques

1. Souches fongiques d'intérêt

Les souches suivantes isolées au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Lille et conservées en bouillon glycérolé à -20°C , ont été utilisées comme témoins positifs :

- 2 souches de *T. asahii* (n°1 et 8),
- 1 souche de *T. inkin* (n°2),
- 1 souche de *T. faecale* (n°10),
- 1 souche de *T. coremiiforme* (n°15),
- 3 souches de *R. mucilaginosa* (n°5, 6 et 7).

Des souches de levures appartenant aux *phyla* des *Basidiomycota* et des *Ascomycota* ont été utilisées pour les tests de réactions croisées (Tableau 12).

Tableau 12 : Souches utilisées pour les expériences de réactions croisées de qPCR.

Basidiomycètes	n°	Ascomycètes	n°
<i>M. pachydermatis</i>	17	<i>C. albicans</i>	9
<i>C. neoformans</i> EEQ	3	<i>C. krusei</i>	4
<i>C. neoformans</i> sérotype A CNRMA	12	<i>C. parapsilosis</i>	16
<i>C. neoformans</i> sérotype D CNRMA	13	<i>C. tropicalis</i>	17
<i>C. neoformans</i> hybride A/D CNRMA	11	<i>C. metapsilosis</i>	18
<i>C. gattii</i>	14		

Numérotation arbitraire utilisée lors des différents essais.

Toutes les souches ont été réisolées à partir d'un aliquot glycérolé congelé à -20°C sur milieu Sabouraud additionné d'Amikacine et sur milieu chromogène CHROMagar™. Les milieux de culture ont été incubés à 30°C pendant un minimum de 48 heures. Toutes les souches ont été réidentifiées par spectrométrie de masse MALDI-ToF par l'intermédiaire du système MALDI Biotyper® sirius (Bruker).

L'identification par spectrométrie de masse des isolats a été réalisée selon le protocole suivant :

Une öse d'un microlitre de colonies a été mise en suspension dans un microtube de 1,5 ml, pré-rempli de 300 µl d'eau stérile. Après homogénéisation du mélange, 900 µl d'éthanol absolu ont été ajoutés puis le mélange a été agité par vortex pendant une dizaine de secondes. Le tube a ensuite été centrifugé pendant 10 minutes à 13 000 rpm. Une fois le tube centrifugé, un culot était visible au fond du celui-ci. Le mélange d'eau pure/éthanol absolu a ensuite été éliminé. Le tube a été retourné afin de sécher à température ambiante sur du papier absorbant jusqu'à élimination complète des résidus d'éthanol. Une fois le tube sec, 50 µl d'acide formique à 70 % ont été ajoutés pour remettre en suspension le culot par aspiration/refoulement. Enfin, le tube a été

centrifugé pendant 2 minutes à 13 000 rpm. Sur une plaque 96 puits réutilisable, 1,2 µl du surnageant ont été déposés. Une fois le dépôt sec, 1,2 µl d'acide α-cyano-4-hydroxycinnamique (HCCA, Bruker) ont été ajoutés sur chaque dépôt, puis la plaque a été séchée à température ambiante. Les profils protéiques générés ont été comparés de façon automatisée sur la base de données fournisseur (logiciel MBT Compass Explorer, Bruker) ainsi que sur la base de données MSI 2.0.

L'identification de l'espèce était validée par l'obtention d'un :

- Score ≥ 2 ,
- Score entre 1.7 et 1.999, si les 5 premières identifications proposées étaient identiques,
- Dans les autres cas, l'extraction et l'identification ont été réitérées.

2. Extraction et quantification de l'ADN fongique

Chaque souche a été homogénéisée dans des microtubes à vis de 2 ml (SARSTEDT, Inc) contenant 500 µl d'eau stérile (Ambion™ Nuclease-Free Water) et des billes de verre de 425-600 µm de diamètre (Sigma Aldrich). L'extraction de l'ADN des souches a été réalisée de la manière suivante :

- La lyse mécanique des levures par les billes de verres a été réalisée sur l'automate MagNA Lyser (Roche), en utilisant un cycle de 7000 rpm pendant 70 secondes,
- Une pré-lyse chimique des souches a été effectuée par l'intermédiaire d'une solution de protéinase K pendant une heure, suivie d'une lyse par un tampon de lyse T1,
- Les étapes de lyses chimiques et d'extraction de l'ADN sur colonne de silice ont été effectuées par le kit d'extraction d'ADN NucleoSpin® Tissue (Macherey-Nagel) de façon automatisée sur le robot pipeteur-distributeur MICROLAB STARlet (Hamilton®).

Les extraits d'ADN ont été recueillis dans un volume d'environ 60 à 100 µl (pour 150 µl de tampon d'élution) dans des tubes juppés ClearLine® à vis de 0,5 ml puis ont été conservés à + 4°C.

La concentration d'ADN présente dans les extraits de souches a été quantifiée par l'intermédiaire de l'automate de spectrophotométrie Thermo Scientific™ NanoDrop One.

Les concentrations d'acides nucléiques ont été calculées à partir de la valeur d'absorbance à 260 nm. Les valeurs d'absorbance à 230, 260 et 280 nm ont été utilisées pour calculer les rapports 260/280 (valeur attendue > 1,8, ratio plus faible témoignant d'une pollution de l'extrait par des protéines et/ou des composés phénoliques) et 260/230 (valeur attendue > 1,8, ratio plus faible témoignant d'une absorption d'un composé à 230 nm, tels que l'EDTA, les sucres ou le phénol).

C. Amplification de l'ADN fongique

1. Mélanges réactionnels

Un *master mix* désigne un mélange disposant de tous les éléments nécessaires à la qPCR. En dehors des amorces et des sondes, il comprend classiquement :

- Une Taq polymérase,
- Un mélange de dNTPs, classiquement : A, G, C, T (T pouvant être remplacé par U selon les milieux),
- Du MgCl₂,
- Un tampon pH.

Les différences de composition au sein des milieux réactionnels ont probablement une incidence sur le rendement de la qPCR. Elles déterminent également le programme d'amplification à utiliser. Afin d'identifier l'importance du milieu réactionnel sur l'efficacité de qPCR, trois milieux réactionnels ont été utilisés et comparés (Tableau 13).

Tableau 13 : Caractéristiques des différents milieux réactionnels utilisés.

Nom	Brilliant Multiplex QPCR Master Mix	TaqMan® Universal PCR Master Mix	LightCycler® 480 Probes Master
Nom d'usage	Agilent	Applied	Roche
Fournisseur	Agilent Technologies	Applied biosystems	Roche
Référence	600553	4304437	04 707 494 001
dTTP ou dUTP	dTTP	dUTP	dUTP
Concentration initiale	2x	2x	2x
Taq polymérase	SureStart Taq DNA Polymerase	AmpliTaq Gold® DNA Polymerase, UP (Ultra Pure)	FastStart Taq DNA Polymerase
	Polymérase à chaud (<i>hot-start</i>) Inactive jusqu'à des températures de 92-95°C		

Contient de l'UNG (Uracil-N glycosylase)	NON	OUI	NON
MgCl₂	Concentration initiale : 11 mM	Mg ²⁺ présent, concentration inconnue	Concentration initiale : 6.4 mM
Colorant de référence passive	OUI, mais facultatif, présent séparément	OUI (colorant ROX™), inclus dans le milieu	NON
Prix et volume	267,30 € / 2,5 ml	298,16 € / 5 ml	587,33 € pour les 5 microtubes de 1ml
Prix par ml	106,92 € / ml	59,63 € / ml	117,47 € / ml

Les amorces et les sondes BHQ (Eurofins Genomics) ont été reconstituées avec un volume d'eau stérile (Nucléase free) recommandé par le fournisseur afin d'obtenir une concentration de 100 µM. Elles ont ensuite été congelées à une température de - 20°C.

Des aliquots de 20 µM et de 10 µM, respectivement pour les amorces et les sondes, ont été préparés puis ont été conservés à - 20°C. Les sondes MGB (Applied biosystems), reçues sous forme liquide à une concentration de 100 µM ont été congelées à une température de - 20°C, puis ont été diluées afin de préparer des aliquots de 10 µM.

Une gamme de concentration d'amorces a été utilisée afin d'établir la concentration optimale de chaque amorce en utilisant un kit Brilliant II SYBR® Green (ref : 600828). La concentration optimale d'amorces est la concentration la plus faible donnant le Cq le plus précoce et un niveau acceptable de fluorescence, en l'absence de dimères d'amorces.

Ensuite, la concentration optimale de chaque sonde a été déterminée. La concentration optimale de sondes doit permettre le Cq le plus précoce tout en conservant un aspect convenable des différentes phases (exponentielle, linéaire et plateau) au cours de l'amplification de qPCR.

Chaque réaction de qPCR a été effectuée dans un volume final de 25 µl, dont 5 µl d'extrait d'ADN (Tableau 14) dans une plaque 96 puits MicroAmp™ Optical (Applied Biosystems™).

Tableau 14 : Composition du mélange réactionnel

Réactifs	Concentration Initiale (μM)	Concentration Finale (μM)	Volume/puit (μl)
Eau			5,750
Master Mix	2	1	12,500
Amorce sens	20	0,2*	0,250
Amorce anti-sens	20	0,2*	0,250
Sonde	10	0,2*	1,250
Extrait d'ADN			5

*Concentration dépendante des amorces et sondes étudiées.

2. Thermocycleur et amplification

Tous les tests de qPCR ont été réalisés sur l'automate de PCR en temps réel QuantStudio™ 5 (Applied Biosystems™).

La fluorescence produite par les sondes d'hydrolyses a été détectée sur les canaux FAM et HEX (longueur d'onde équivalente au fluorophore VIC).

Le thermocycleur QuantStudio™ 5 possède un bloc de 96 puits dotés de la technologie VeriFlex™ permettant de définir six zones de température indépendantes. Ces blocs ont été utilisés afin de déterminer l'efficacité d'une qPCR à différentes températures lors d'une même analyse (Figure 29).

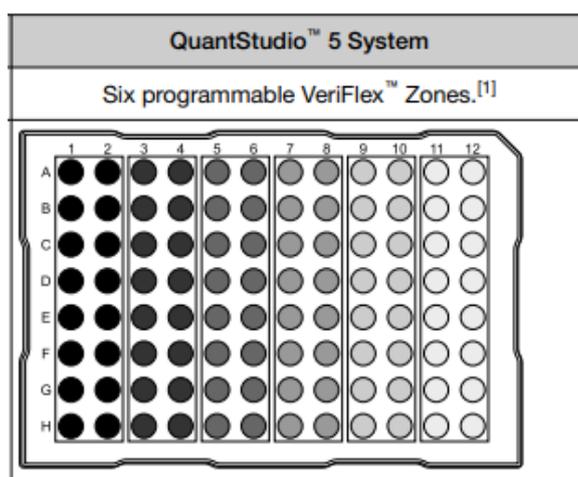


Figure 29 : Représentation des différentes zones de température de la technologie VeriFlex™

Le programme d'amplification a été adapté en fonction du *master mix* et du T_m des amorces.

Le programme d'amplification recommandé par le fournisseur lors de l'utilisation du *master mix* Brilliant Multiplex QPCR a été décrit dans le Tableau 15.

Tableau 15 : Programme d'amplification appliqué sur l'automate QuantStudio™ 5

Nombre de cycles	Durée du cycle	Température	Étape
1	10 minutes	95°C	Activation de la Taq Polymérase
40	15 secondes	95°C	Dénaturation
	10 minutes	Température selon le T_m des amorces	Hybridation

Des témoins positifs contenant de l'ADN de *T. asahii* et de *R. mucilaginosa*, et des témoins négatifs (NTC : No Template Control) correspondant à un échantillon d'eau qualité PCR, ont été utilisés au cours des différents essais.

Afin d'étudier son influence sur l'efficacité de la qPCR, du chlorure de magnésium ($MgCl_2$) (LightCycler® FastStart DNA Master HybProbe, $MgCl_2$ stock solution, 25 mM), a été utilisé au cours d'un essai de mise au point.

L'Uracil-DNA Glycosylase (UNG), est une enzyme hydrolysant les liaisons glycosidiques contenant de l'uracile au sein l'ADN simple ou double brin, permettant de diminuer les contaminations inter-amplification en hydrolysant les brins d'ADN néoformés contenant de l'uracile. L'UNG a été utilisée lors d'un essai de qPCR afin d'étudier son incidence sur d'éventuelles contaminations (UNG recombinante, Roche ref : 03539806).

D. Évaluation et validation des qPCR

1. Efficacité

Les courbes standards permettant le calcul de l'efficacité de la qPCR ont été obtenues à partir des résultats de deux répliquats de cinq à six dilutions en série des extraits d'ADN de *T.asahii* et *R. mucilaginosa*.

Les droites de régression ont été construites automatiquement par le module QuantStudio™ 5 en traçant le logarithme de la concentration initiale en ADN ajoutée

dans le puit par rapport à la valeur de Cq correspondante. La courbe standard linéaire permet le calcul du coefficient de corrélation R², un R² > 0,98 est considéré comme acceptable (96).

La formule permettant le calcul de l'efficacité (E) utilisée par le logiciel QuantStudio™ 5 est la suivante : $E = [10^{(-1/slope)}] - 1$. Avec *slope* : pente de la courbe standard, représentant l'écart de Cq entre deux dilutions au 1/10^{ème}. Une efficacité comprise entre 90 et 110% est considérée comme acceptable (96).

2. Spécificité analytique

L'évaluation de la spécificité analytique des différentes qPCR a été réalisée en utilisant de l'extrait d'ADN de différentes souches de levures (Tableau 16).

Les extraits d'ADN ont été utilisés à de fortes concentrations (> 5ng/μl). Les souches testées pour les essais de réactions croisées ont été sélectionnées selon la disponibilité des extraits et les résultats obtenus au cours de l'étude.

Tableau 16 : Liste des abréviations utilisées pour les résultats de réactions croisées

Nom d'espèce	Abréviation utilisée
<i>C. albicans</i>	C.alb
<i>C. krusei</i>	C.kru
<i>C. parapsilosis</i>	C.para
<i>C. tropicalis</i>	C.tropi
<i>C. metapsilosis</i>	C.meta
<i>M. pachydermatis</i>	Mala
<i>C. neoformans</i> EEQ	C.neo eeq
<i>C. neoformans</i> sérotype A CNRMA	C.neo A
<i>C. neoformans</i> sérotype D CNRMA	C.neo D
<i>C. neoformans</i> hybride A/D CNRMA	C.neo A/D
<i>C. gattii</i>	C.gattii

3. Limite de détection/sensibilité analytique

La LoD (*Limit of Detection*) est généralement considérée comme la concentration la plus faible pouvant détectée au moins 95 % des mesures répétées d'un même échantillon, nommée LoD₉₅ (98).

La limite de détection a été déterminée à partir de l'extrait d'ADN de *R. mucilaginosa* sur une gamme de concentration allant de 10 ng/μl à 10⁻⁸ ng/μl. Les quatre concentrations les plus basses ont été analysées sur vingt réplicats, afin d'augmenter la précision de la LoD₉₅.

4. Répétabilité

La répétabilité est la valeur minimale de la fidélité, s'évaluant par la dispersion (écart-type) de mesures indépendantes obtenues avec des échantillons identiques, par un même opérateur utilisant le même équipement et dans un intervalle de temps court (une même série).

Le nombre minimal de répétitions par niveau est de 2. Il est recommandé de tester plusieurs niveaux de concentrations (99).

La répétabilité de l'amplification a été évaluée pour deux concentrations d'ADN différentes, estimées forte (0,001 ng/μl) et faible (10⁻⁵ ng/μl), sur six échantillons identiques de *R. mucilaginosa*.

La répétabilité est estimée à l'aide du coefficient de variation (CV) en % calculé selon la formule suivante : $CV = \frac{\text{écart-type}}{\text{moyenne}} \cdot 100$. Un CV < 5 % était le critère d'acceptabilité utilisé pour la mesure de la répétabilité.

IV. Résultats

A. qPCR sur les régions 5,8S et ITS

1. Gamme de concentration d'amorces et sondes

a. Gamme d'amorces

Une gamme de concentration d'amorces de 100 à 500 nM a été réalisée avec la méthode SYBR® Green, afin de déterminer la concentration d'amorces permettant l'amplification optimale des souches de *R. mucilaginosa* et *T. asahii*.

Les amorces permettaient une amplification précoce et de qualité pour chaque espèce. L'analyse des courbes de fusion démontrait l'absence de dimères dans les puits contenant de l'ADN fongique. Des dimères d'amorces ont été observés dans les puits contrôles (NTC) pour les *mix* Tri1 ITS, Tri2 ITS, Rho2 ITS et Rho3 ITS. Les courbes d'amplification des dimères dans les puits NTC étaient de faible intensité de fluorescence et tardives ($C_q > 38$) pour les *mix* Tri2 ITS, Rho2 ITS et Rho3 ITS (Tableau 17 et Figure 31). Les courbes d'amplification des dimères du *mix* Tri1 ITS présentaient un C_q d'autant plus précoce que la concentration d'amorce présente dans le puit était élevée (Figure 30).

Tableau 17 : Résultats des gammes de concentration des différentes amorces

Mix	Concentrations d'amorces permettant le C_q le plus précoce	Dimères d'amorces dans les puits NTC	Concentration d'amorce optimale retenue
Tri1 ITS	200, 300, 400, 500 nM	Présence : dans tous les puits NTC	200 nM
Tri2 ITS	100, 200, 300, 400, 500 nM	Présence : faibles amplifications à 100, 300, 400, 500 nM	200 nM
Rho1 ITS	300, 400, 500 nM	Absence	300 nM
Rho2 ITS	200, 300, 400, 500 nM	Présence : faibles amplifications à 400, 500 nM	200 nM
Rho3 ITS	200, 300, 400, 500 nM	Présence : faibles amplifications à 100, 300, 400, 500 nM	200 nM

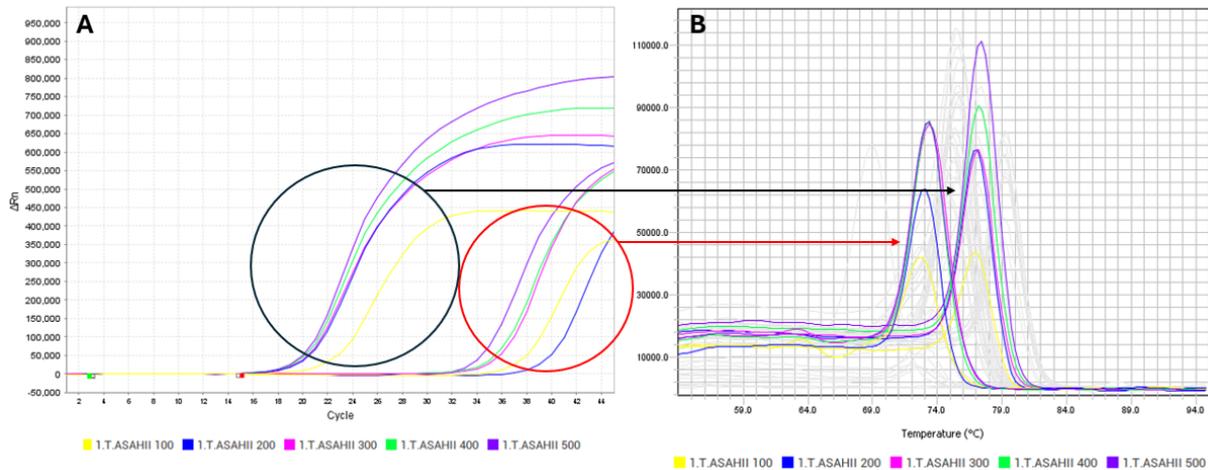


Figure 30 : Étude de la gamme de concentration d'amorces du *mix Tri1 ITS* pour l'amplification de *T. asahii*.

Amplifications de *T. asahii* (en noir) et des dimères d'amorces dans les puits NTC (en rouge). (A) courbes d'amplification (linéaire) et (B) courbes de dissociation. Chaque courbe représente une concentration d'amorce dans le milieu réactionnel (en nM).

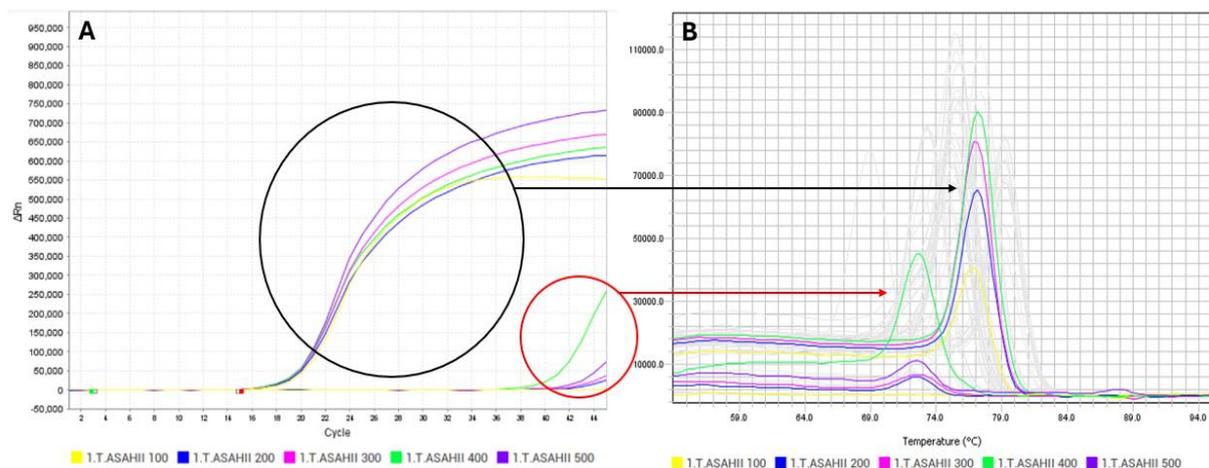


Figure 31 : Étude de la gamme de concentration d'amorces du *mix Tri2 ITS* pour l'amplification de *T. asahii*.

Amplifications de *T. asahii* (en noir) et des dimères d'amorces dans les puits NTC (en rouge). (A) courbes d'amplification (linéaire) et (B) courbes de dissociation. Chaque courbe représente une concentration d'amorce dans le milieu réactionnel (en nM). Les mix Rho2 ITS et Rho3 ITS présentaient des résultats similaires (graphiques non représentés).

b. Gamme de sondes

Une gamme de concentration de sondes de 100 à 500 nM a été utilisée afin de déterminer la concentration permettant l'amplification optimale des souches de *R. mucilaginosa* et *T. asahii*.

Les sondes permettaient une amplification précoce et de qualité pour chaque espèce. La valeur du cycle seuil (Cq) n'était pas impactée par la concentration de

sondes. Pour l'ensemble des *mix*, l'intensité de fluorescence était proportionnelle à la concentration de sondes (Figure 32). Une nette augmentation de l'intensité de fluorescence a été observée entre les concentrations de 100 nM et 200 nM. La variation de fluorescence entre les autres concentrations de sondes était plus faible. La concentration optimale de sondes était fixée à 200 nM.

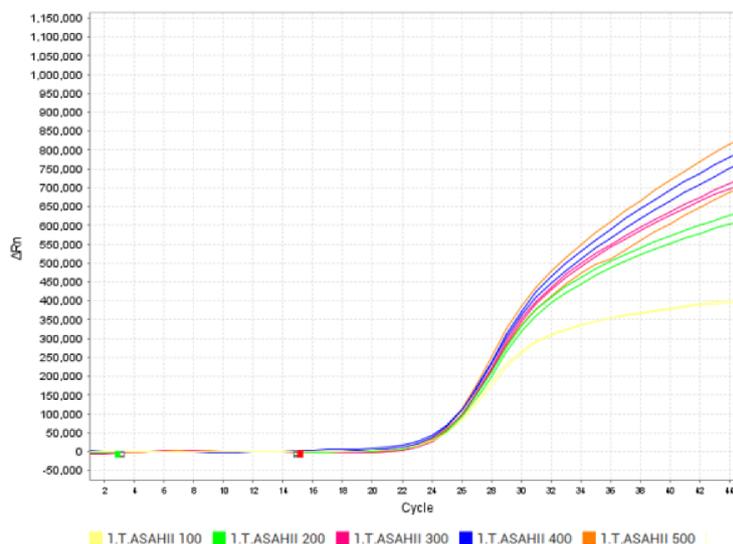


Figure 32 : Courbe d'amplification de *T. asahii* pour la qPCR Tri1 ITS en fonction de la concentration de sonde dans le milieu réactionnel (en nM)

Courbes d'amplification des autres mix d'allure identique, graphiques non représentés.

2. Efficacité de qPCR – Dépendance du *Master Mix*, de la température d'hybridation et de la concentration de $MgCl_2$?

a. *Master Mix* et température

L'efficacité des différentes qPCR a été déterminée avec deux *master mix* différents (Applied et Agilent) et à deux températures d'hybridations différentes (54°C et 56°C).

L'efficacité de qPCR était meilleure pour le *master mix* Agilent en comparaison avec le *master mix* Applied. La température d'hybridation ne semblait pas avoir d'influence sur l'efficacité.

Les *mix* Tri2 ITS et Rho3 ITS présentaient les meilleures efficacités, respectivement pour l'amplification des genres *Trichosporon* et *Rhodotorula* avec le *mix* Agilent (Tableau 18). Le *master mix* Agilent a été sélectionné afin de réaliser les expériences ultérieures.

Tableau 18 : Résultats d'efficacité des qPCR en fonction du *master mix* et la température d'hybridation

Nombre de points	Applied 54°C		Applied 56°C		Agilent 54°C		Agilent 56°C	
	5 points	6 points						
Efficacité Tri1 ITS (%)	84,01	84,10	83,40	80,88	89,55	86,94		
Efficacité Tri2 ITS (%)	82,26	83,77	83,17	83,35	94,71	95,26	93,20	96,04
Efficacité Rho 1 ITS (%)	73,98	79,03	71,53	75,45	76,69	79,18	80,31	77,56
Efficacité Rho 2 ITS (%)	70,19	76,22	71,75	76,24	82,10	85,49		
Efficacité Rho 3 ITS (%)	78,16	82,87	74,97	75,80	90,86	88,67	93,23	93,14

Les dilutions successives au 1/10^{ème} ont été effectuées à partir d'une concentration en ADN de 10 ng/μl pour le master mix Applied et de 5 ng/μl pour le master mix Agilent.

Une gamme de température allant de 52°C à 62°C a été réalisée. L'efficacité des trois premiers *mix* semblait augmenter à partir d'une température d'hybridation de 60°C (Tableau 19). Cependant, l'intensité de fluorescence des courbes d'amplification diminuait pour l'ensemble des qPCR à partir d'une température d'hybridation de 58°C (Figure 33). La température d'hybridation de 54°C a donc été sélectionnée afin de réaliser les expériences ultérieures.

Tableau 19 : Efficacité des différents mix en fonction des températures d'hybridation.

	Agilent 52°C	Agilent 54°C	Agilent 56°C	Agilent 58°C	Agilent 60°C	Agilent 62°C
Efficacité Tri1 ITS (%)	83,46	82,23	81,02	78,14	84,26	84,83
Efficacité Tri2 ITS (%)	87,84	89,95	88,94	87,69	86,01	90,83
Efficacité Rho2 ITS (%)	72,71	70,30	73,05	71,26	73,84	78,32
Efficacité Rho3 ITS (%)	72,82	73,85	71,82	71,36	69,73	71,63

Les efficacités ont été calculées sur 4 points en simplicat. La gamme de température a été réalisée sur une même plaque de qPCR.

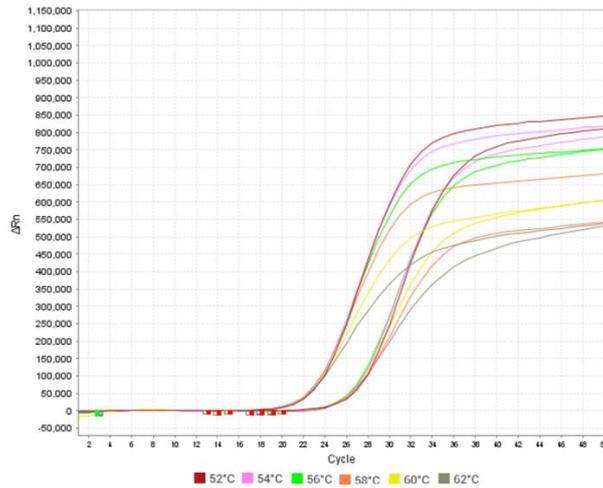


Figure 33 : Courbes d'amplification de la qPCR Rho2 ITS pour les concentrations en ADN de *R. mucilaginosa* de 5 ng/μl et 0,5 ng/μl en fonction de la température d'hybridation.

Courbes d'amplification des autres mix d'allure identique, graphiques non représentés.

b. Concentration de MgCl₂

Afin d'augmenter l'efficacité ($E = 80,30\%$) de la qPCR Rho1 ITS, une gamme de MgCl₂ a été réalisée. Aucune différence d'amplification (C_q et intensité de fluorescence) n'a été mise en évidence suite à l'ajout de MgCl₂ dans le milieu réactionnel, quelle que soit la concentration utilisée (Figure 34).

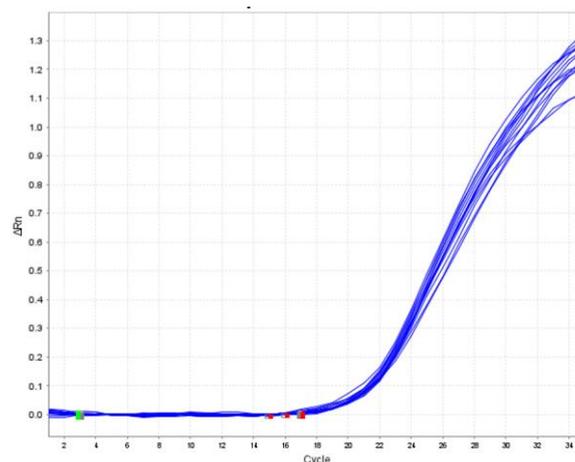


Figure 34 : Courbes d'amplification de la qPCR Rho1 ITS en fonction des concentrations croissantes de MgCl₂ dans le milieu réactionnel.

La gamme de MgCl₂ a été réalisée en duplicat avec des concentrations de 0, 1, 2, 3, 4, 5, et 6 mM de MgCl₂ ajoutées dans le milieu réactionnel.

3. Réactions croisées

a. qPCR *Trichosporon* spp.

Les qPCR Tri1 ITS et Tri2 ITS amplifiaient de manière adéquate l'ADN de *T. asahii*, *T. faecale* et *T. inkin*. Des réactions croisées étaient observées vis-à-vis de *C. albicans*, *C. krusei* et *C. parapsilosis* pour le *mix* Tri1 ITS, et vis-à-vis de *C. albicans* pour le *mix* Tri2 ITS (Tableau 20).

Tableau 20 : Résultats des réactions croisées des *mix* Tri1 ITS et Tri2 ITS

<i>mix</i>	<i>essai</i>	R.muci n°5	C.alb	C.kru	C.meta	C.para	C.neo A	C.neo D	C.neo A/D	C.neo eeq	C.gattii
Tri1 ITS	N°1	0/1	1/1 Cq : 29,73	1/1 Cq : 28,93			0/1				0/1
	N°2		2/2 Cq : 28,3-40,3	1/1 Cq : 35,35		1/1 Cq : 35,49					
Tri2 ITS	N°1	0/1	2/2 Cq : 41-43,19	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

Les cases vertes et rouges représentent respectivement l'absence et la présence d'amplification, avec les Cq correspondants et le nombre de puits positifs sur le nombre de puits testés. Les cases grises représentent les extraits non testés au cours de l'essai.

b. qPCR *Rhodotorula* spp.

La qPCR Rho1 ITS ne présentait pas de réactions croisées. La qPCR Rho2 ITS amplifiait l'ADN de *C. albicans* et *C. parapsilosis*. La qPCR Rho3 ITS amplifiait l'ADN de *C. albicans*, *C. krusei*, *T. asahii* et de *C. neoformans* sérotype A. L'amplification de l'espèce *C. neoformans* sérotype A n'a été objectivée que sur un test sur deux (Tableau 21).

Tableau 21 : Résultats des réactions croisées des *mix* Rho1, 2 et 3 ITS

<i>mix</i>	<i>essai</i>	T.asa	T.inkin	T.fae	C.albi	C.kru	C.meta	C.para	C.neo A	C.neo D	C.neo A/D	C.neo eeq	C.gattii
Rho1 ITS	N°1	0/1	0/1	0/1	0/2	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
Rho2 ITS	N°1				1/1 Cq : 45,3			1/1 Cq : 47,4					
Rho3 ITS	N°1	1/1 Cq : 41,61	0/1	0/1	2/2 Cq : 42,9-48	1/1 Cq : 45,13			1/1 Cq : 39,24				0/1
	N°2	1/1 Cq : 39,4			1/1 Cq : 41,29				0/1				

Les cases vertes et rouges représentent respectivement l'absence et la présence d'amplification, avec les Cq correspondants et le nombre de puits positifs sur le nombre de puits testés. Les cases grises représentent les extraits non testés au cours de l'essai.

De nouvelles amorces et sondes ont été développées sur d'autres régions génomiques, du fait du manque d'efficacité de la qPCR Rho1 ITS et de spécificité des autres qPCR ciblant les régions *5,8S* et *ITS*.

B. qPCR sur les régions 28S et IGS

1. Gamme de concentration d'amorces et sondes

a. Gamme d'amorces

Les amorces permettaient une amplification précoce et de qualité pour chaque espèce.

Les Cq étaient identiques quelle que soit la concentration d'amorces pour les qPCR Tri2 IGS et Rho2 28S. Le Cq était plus précoce avec une concentration d'amorce à 200 nM pour les qPCR Tri1 IGS, Rho1 IGS et T.asa3 (Tableau 22 et Figure 35). L'analyse des courbes de fusion démontrait l'absence de dimère dans les puits contenant de l'ADN fongique. Des dimères d'amorces ont été observés dans les puits contrôles (NTC) avec des courbes d'amplifications tardives (Cq > 34) et de faibles intensités de fluorescence. La présence de dimères n'était pas dépendante de la concentration d'amorce dans le mélange réactionnel (Figure 35).

La concentration idéale d'amorce était fixée à 200 nM pour tous les *mix* afin d'harmoniser la préparation des différents mélanges réactionnels.

Tableau 22 : Résultats des gammes de concentration des différentes amorces

Mix	Concentrations d'amorces permettant le Cq le plus précoce	Dimères d'amorces dans les puits NTC	Concentration d'amorce optimale	Concentration d'amorce retenue
Tri1 IGS	200, 300, 400, 500 nM	Absence	200 nM	200 nM
Tri2 IGS	100, 200, 300, 400, 500 nM	Présence : faibles amplifications à 300 et 500 nM	100 nM	
T.asa 3	200, 300, 400, 500 nM	Absence	200 nM	
Rho1 28S	200, 300, 400, 500 nM	Présence : faibles amplifications à 100, 200, 300 500 nM	200 nM	
Rho2 28S	100, 200, 300, 400, 500 nM	Présence : faibles amplifications à toutes les concentrations	100 nM	

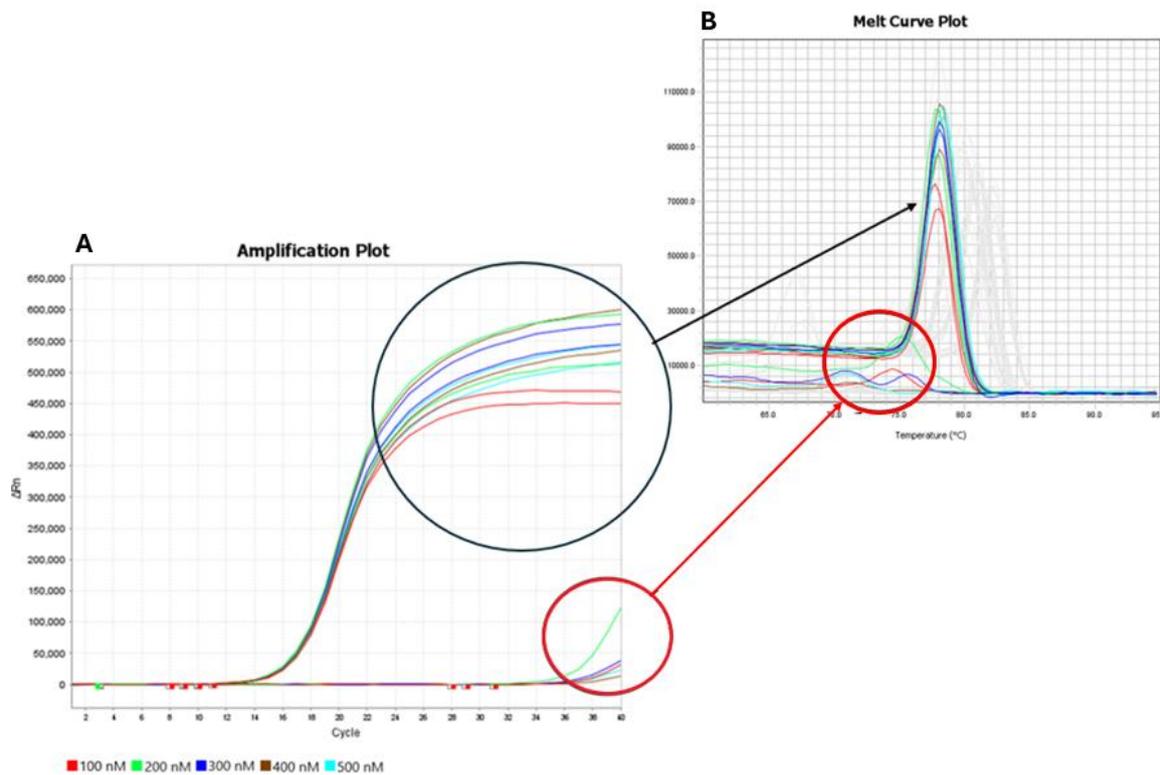


Figure 35 : Étude de la gamme de concentration d'amorces pour l'amplification de *R. mucilaginosa* pour la qPCR Rho2 28S.

(A) courbes d'amplification (linéaire) et (B) courbes de dissociation.
 Courbes d'amplification des mix Rho1 28S et Tri2 IGS d'allure identique, graphiques non représentés.

b. Gamme de sondes

Les sondes permettaient une amplification précoce et de qualité pour chaque espèce.

Les Cq étaient identiques, quelle que soit la concentration de sonde, pour l'ensemble des *mix*. L'intensité de fluorescence était proportionnelle à la concentration de sonde. Une nette augmentation de l'intensité de fluorescence a été observée entre les concentrations de sondes à 100 nM et 200 nM. La variation de fluorescence entre les autres concentrations de sondes était plus faible (Figure 36).

La concentration optimale de sondes était de 200 nM pour l'ensemble des *mix*.

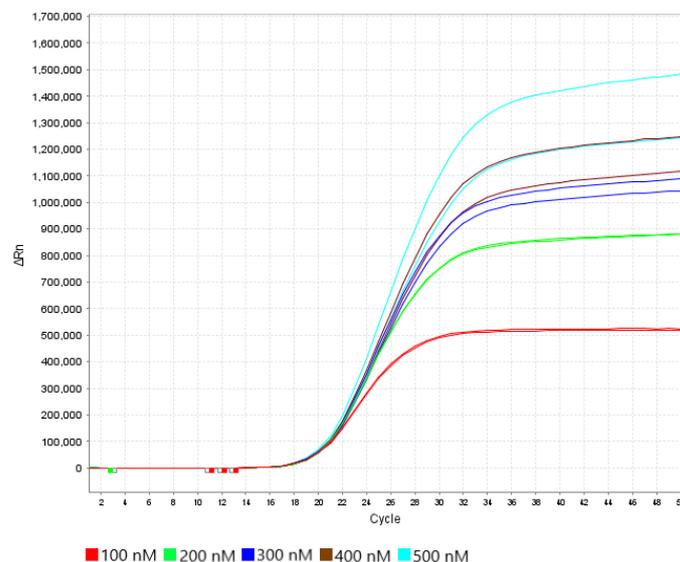


Figure 36 : Courbe d'amplification de l'ADN de *R. mucilaginosa* par la qPCR Rho2 28S en fonction de la concentration de sonde dans le mélange réactionnel.

Courbes d'amplification des autres mix d'allure identique, graphiques non représentés.

2. Réactions croisées

Les qPCR Tri1 IGS et Tri2 IGS amplifiaient de manière adéquate l'ADN de différentes espèces de *Trichosporon* : *T. asahii*, *T. faecale*, *T. inkin* et *T. coremiiforme*. Les qPCR Rho1 28S et Rho2 28S amplifiaient de manière adéquate d'ADN de *R. mucilaginosa*.

a. Tri1 IGS

La qPCR Tri1 IGS amplifiait l'ADN de trois isolats de *R. mucilaginosa*. Le Cq était inversement proportionnel à la concentration d'ADN en *R. mucilaginosa*. Aucune différence d'amplification de *R. mucilaginosa* n'a été mise en évidence en modifiant la température d'hybridation (Tableau 23, essai 3).

Tableau 23 : Résultats des différents tests de réactions croisées de la qPCR Tri1 IGS.

essai	R.muci n°5	R.muci n°6	R.muci n°7	C.alb	C.kru	C.meta	C.para	C.neo A	C.neo D	C.neo A/D	C.neo eeq	C.gattii
N°1	1/1 Cq 42,47			0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
N°2	6/6 Cq 39,6-40,4	6/6 Cq 40,5-42,8	4/4 Cq 37-40,8									
N°3			6/6 Cq 38-39									

Les cases vertes et rouges représentent respectivement l'absence et la présence d'amplification, avec les Cq correspondants et le nombre de puits positifs sur le nombre de puits testés. Les cases grises représentent les extraits non testés au cours de l'essai.

Essai n°3 : duplicats amplifiés à une température d'hybridation de 56, 58 et 60°C.

b. Tri2 IGS

Certains extraits présentaient une amplification non reproductible au cours des différents essais et de façon hétérogène sur les différents réplicats d'un même essai. Malgré la ré-extraction de l'ADN à partir de nouvelles subcultures, des réactions aléatoires non répétables subsistaient (Tableau 24).

Tableau 24 : Résultats des différents tests de réactions croisées de la qPCR Tri2 IGS.

essai	R.muci n°5	Mala	C.tropi	C.alb	C.kru	C.meta	C.para	C.neo A	C.neo D	C.neo A/D	C.neo eeq	C.gattii
N°1	0/1		0/1	0/1	1/1 Cq : 37,7	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
N°2					0/1							
N°3				2/2 Cq : 37-37,3	0/2							
N°4	0/2		0/1	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	1/1 Cq : 38,5	0/1
N°5	1/3 Cq : 47		0/1	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
N°6	0/4	1/4 Cq : 41	2/4 Cq : 42-43,8	0/4	0/4		1/4 Cq : 43,8	1/4 Cq : 46	0/4	1/4 Cq : 42,5	0/4	0/4

Les cases vertes et rouges représentent respectivement l'absence et la présence d'amplification, avec les Cq correspondants et le nombre de puits positifs sur le nombre de puits testés. Les cases grises représentent les extraits non testés au cours de l'essai.

Essai n°4 et n°5 : utilisation d'ADN nouvellement extrait pour les souches *C. albicans* et *C. krusei*. **Essai n°6** : nouvelles subcultures pour l'ensemble des souches et utilisation d'ADN nouvellement extrait pour toutes les espèces.

c. T.asa3 IGS

Des réactions croisées aléatoires ont été mises en évidence pour la qPCR T.asa3 IGS sur *T. inkin* et *C. albicans* (Tableau 25).

Tableau 25 : Résultats des différents tests de réactions croisées de la qPCR T.asa3 IGS.

	R.muci n°5	Mala	T.inkin	T.cor	T.fae	C.tropi	C.alb	C.kru	C.meta	C.para	C.neo A	C.neo D	C.neo A/D	C.neo eeq	C.gattii
N°1	0/1		0/1	0/1	0/1	0/1	1/1 Cq : 41,26	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
N°2							0/1								
N°3							0/2	0/2							
N°4	0/2		1/1 Cq : 42,15	0/1	0/1	0/1	0/3	0/3	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

Les cases vertes et rouges représentent respectivement l'absence et la présence d'amplification, avec les Cq correspondants et le nombre de puits positifs sur le nombre de puits testés. Les cases grises représentent les extraits non testés au cours de l'essai.

Essai n°4 : utilisation d'ADN nouvellement extrait pour les souches *C. albicans* et *C. krusei*.

d. Rho1 et Rho2 IGS

Le premier essai de réactions croisées des qPCR Rho1 28S et Rho2 28S ne révélait pas d'amplification parmi les espèces sélectionnées en simplicat (Tableau 26 et Tableau 27, essai n°1).

L'essai n°2 de réactions croisées de la qPCR Rho2 28S réalisé sur plusieurs réplicats a démontré des amplifications aléatoires (Tableau 27 et Figure 37).

Seul l'extrait de *C. neoformans* EEQ présentait une amplification lors de l'essai n°5 (Tableau 27 et Figure 38). La souche réextraite n'a pas présenté d'amplification lors de l'essai n°7, infirmant une possible réaction croisée de la qPCR Rho2 28S sur *C. neoformans* (Tableau 27).

Tableau 26 : Résultats de l'essai de réactions croisées de la qPCR Rho1 28S.

essai	T.asa	T.cor	T.fae	T.inkin	Mala	C.tropi	C.alb	C.kru	C.meta	C.para	C.neo A	C.neo D	C.neo A/D	C.neo eeq	C.gattii
N°1	0/1	0/1	0/1	0/1		0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1

Les cases vertes représentent l'absence d'amplification de l'ADN. La case grise représente l'extrait non testé au cours de l'essai.

Tableau 27 : Résultats des différents tests de réactions croisées de la qPCR Rho2 28S.

essai	T.asa	T.cor	T.fae	T.inkin	Mala	C.tropi	C.alb	C.kru	C.meta	C.para	C.neo A	C.neo D	C.neo A/D	C.neo eeq	C.gattii
N°1	0/1	0/1	0/1	0/1		0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1	0/1
N°2		0/4	2/4 Cq : 38,5-46			1/4 Cq : 46,26	1/4 Cq : 41,66		0/4	0/4	1/4 Cq : 42,8			0/4	
N°3			1/3 Cq : 39,2			0/4	0/7								
N°4			0/12			0/12	0/12				0/12				
N°5	0/8	0/7	0/8	0/7		0/8	0/8	0/8		0/8	0/8		0/7	2/8 Cq : 37-37,8	
N°6														11/32 Cq : 34-38,1	
N°7					0/4						0/4	0/4	0/4	0/8	0/4

Les cases vertes et rouges représentent respectivement l'absence et la présence d'amplification, avec les Cq correspondants et le nombre de puits positifs sur le nombre de puits testés. Les cases grises représentent les extraits non testés au cours de l'essai.

Essai n°2 : extraits analysés en quadruplicat. **Essai n°5** : nouvelles subcultures pour l'ensemble des souches et amplification d'ADN nouvellement extrait à une température d'hybridation de 58°C et 60°C. **Essai n°6** : amplification de l'extrait d'ADN de *C. neoformans* eeq en duplicat à des températures d'hybridation de 60°C, 62°C, 64°C et 66°C, avec et sans UNG. **Essai n°7** : nouvelles subcultures et amplification d'ADN nouvellement extrait pour la souche *C. neoformans* eeq.

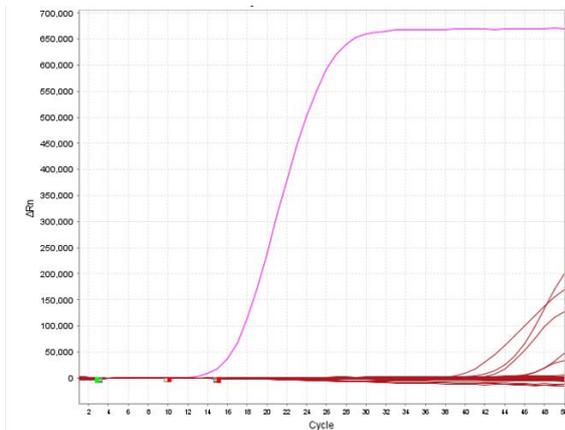


Figure 37 : Courbes d'amplification observées lors de l'essai n°2 de réaction croisée du *mix* Rho2 28S.

En rose : ADN de *R. mucilaginosa*, en rouge ADN des autres espèces amplifiées.

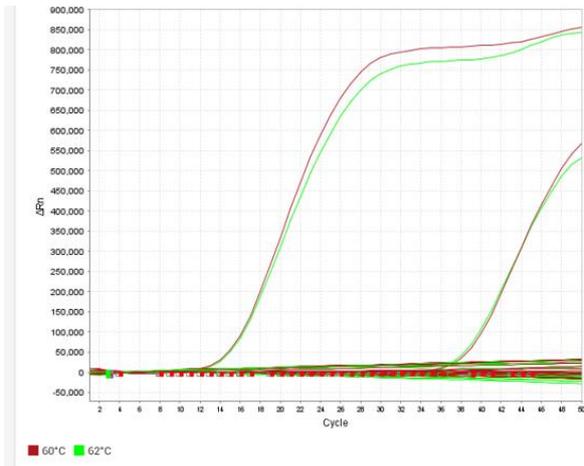


Figure 38 : Courbes d'amplification observées lors de l'essai n°5 de réaction croisée du *mix* Rho2 28S en fonction de la température d'hybridation.

Les deux courbes les plus précoces correspondaient aux contrôles positifs contenant de l'ADN de *R. mucilaginosa*. Les deux courbes tardives ($Cq \approx 37$) étaient des amplifications observées dans les puits contenant de l'extrait d'ADN de *C. neoformans* EEQ.

3. Efficacité de qPCR – Dépendance du *Master Mix*, et de la température d'hybridation.

La qPCR Rho2 28S a montré une meilleure efficacité ($E = 96,8\%$) en comparaison à la qPCR Rho1 28S ($E = 91,63\%$), quelle que soit la température d'hybridation (Tableau 28).

Malgré la faible influence de la température d'hybridation sur l'efficacité de la qPCR Rho2 28S, la température d'hybridation a été fixée à 60°C pour les tests ultérieurs.

Tableau 28 : Résultats d'efficacité des qPCR Rho1 28S et Rho2 28S en fonction de la température d'hybridation

		<i>Rhodotorula 1 28S</i>			<i>Rhodotorula 2 28S</i>		
Température d'hybridation		56°C	58°C	60°C	56°C	58°C	60°C
5 points	Efficacité (%)	89,86	90,58	91,63	96,43	96,97	96,8
	R ²	0,999	0,999	0,994	0,996	0,999	1
	Slope	-3,591	-3,57	-3,54	-3,41	-3,3997	-3,401
6 points	Efficacité (%)	85,35	85,78	88,3	93,13	92,38	92,34
	R ²	0,997	0,997	0,995	0,997	0,998	0,998
	Slope	-3,731	-3,717	-3,638	-3,498	-3,519	-3,52

Les dilutions successives au 1/5^{ème} ont été effectuées à partir d'une concentration en ADN de 10 ng/ul.

Parmi les trois *master mix* testés, l'Agilent présentait la meilleure efficacité (E = 98,75 %) (Tableau 29 et Figure 39).

Tableau 29 : Résultats d'efficacité de la qPCR Rho2 28S en fonction de trois *master mix* différents

	Master mix	Agilent	Applied	Roche
	Température d'hybridation	60°C	60°C	60°C
5 points	Efficacité (%)	98,75	94,4	92,09
	R ²	0,999	0,999	0,999
	Slope	-3,35	-3,463	-3,527
6 points	Efficacité (%)	92,98	87,57	86,59
	R ²	0,997	0,996	0,997
	Slope	-3,502	-3,661	-3,692

Les dilutions successives au 1/5^{ème} ont été effectuées à partir d'une concentration en ADN de 10 ng/μl.

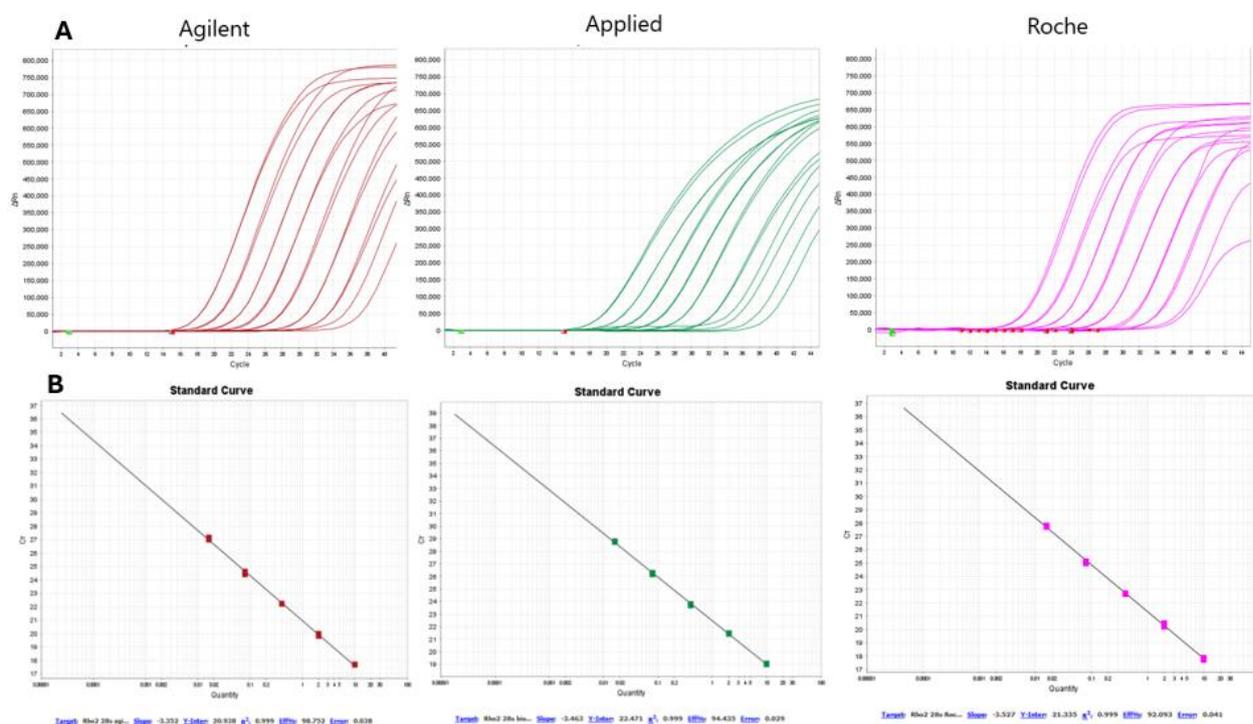


Figure 39 : Courbes d'amplifications et droites standards de la qPCR Rho2 28S en fonction de différents *master mix*.

(A) courbes d'amplification (linéaire) et (B) droite de régression de la courbe standard.

4. Limite de détection : LoD

La limite de détection de la qPCR Rho2 28S (LoD₉₅) a été estimée à 10⁻⁶ ng/μl, soit 1 fg/μl (Tableau 30). L'ensemble des Cq des réplicats sont disponibles en Annexe 6.

Tableau 30 : Limite de détection (LoD₉₅) de la qPCR Rho2 28S

ADN ng/μl	Fréquence de détection	Nombre de réplicats	Cq moyen	Écart-type
1	100%	2	15,00	0,04
0,1	100%	2	17,55	0,01
0,01	100%	2	20,68	0,21
0,001	100%	6	25,22	0,17
0,0001	100%	1	26,68	
10 ⁻⁵	100%	20	34,44	0,47
10 ⁻⁶	100%	20	35,48	0,92
10 ⁻⁷	45%	20	37,93	2,39
10 ⁻⁸	0%	20		

5. Répétabilité

Les résultats des tests de répétabilité de la qPCR Rho 2 28S sur deux concentrations différentes ont été présentés dans le Tableau 31. Le coefficient de variation de la répétabilité était de 0,67 % et 1,16 %, respectivement pour les concentrations de 1 000 fg/μl et 10 fg/μl.

Tableau 31 : Répétabilité de la qPCR Rho2 28S à deux concentrations différentes.

	1000 fg/μl	10 fg/μl
Nombre d'échantillon	6	6
Moyenne	25,22	34,57
Ecart-type	0,17	0,40
CV (%)	0,67	1,16

V. Discussion et perspectives

Extraction de l'ADN fongique

L'extraction d'ADN fongique est une étape clé pour les performances analytiques de la qPCR.

Nous avons extrait nos souches fongiques par l'intermédiaire du protocole d'extraction standard NucleoSpin® Tissu. Ce protocole est fréquemment employé au laboratoire du CHU de Lille pour l'extraction de tissus et de souches bactériennes ou fongiques. L'automate MICROLAB STARlet, permettant l'automatisation de l'étape d'extraction, présentait un taux d'occupation élevé au cours de notre étude. Par conséquent, les extractions des souches ont souvent été retardées, ne permettant pas de disposer de l'intégralité des extraits d'ADN au cours des différents essais.

Les extraits d'ADN des souches de *Trichosporon* spp. et *Cryptococcus* spp. ont été obtenus à de faibles concentrations. La présence d'une grande quantité de polysaccharides au sein de ces deux genres fongiques, entravant la lyse cellulaire, pourrait expliquer le faible rendement d'extraction de l'ADN (100).

Afin d'obtenir un rendement plus important de l'extraction d'ADN, le protocole d'extraction des levures doit être optimisé. Le guide utilisateur NucleoSpin® Tissu préconise des étapes supplémentaires, en comparaison au protocole standard, pour l'extraction de levures. Bien que plus chronophage, ce protocole long pourrait permettre une meilleure lyse des parois cellulaires. En effet, Fredricks *et al.* ont démontré l'obtention de concentrations d'ADN fongique différentes en fonction de la méthode d'extraction utilisée (101).

L'automate NanoDrop One n'était pas adapté pour le dosage de faibles concentrations d'ADN obtenues lors de l'extraction des levures. En effet, la LoD du NanoDrop One est de 2 ng/μl et sa reproductibilité de +/- 2 ng/μl pour les concentrations basses (informations utilisateurs). Bien qu'une faible concentration de 2 ng/μl paraissait suffisante pour l'obtention d'une amplification ($C_q \approx 15$), les spectres d'absorption du NanoDrop One étaient de mauvaise qualité et les rapports de pureté paraissaient erronés. Au cours des essais, une quantité plus importante de colonies fongiques a été extraite, afin d'obtenir une mesure plus précise de la concentration en ADN fongique. Néanmoins, de fortes concentrations de levures ont provoqué le colmatage de la colonne de silice, diminuant ainsi le rendement de l'extraction.

Dans l'étude de Simbolo *et al.*, le NanoDrop présentait des résultats moins reproductibles que les mesures fluorimétriques par méthode Qubit sur des échantillons

histopathologiques. De plus, les concentrations en ADN étaient fortement surestimées par NanoDrop (102). Le NanoDrop est un outil intéressant afin d'évaluer les contaminations, tandis que le Qubit permet une meilleure quantification de l'ADN (103). La quantification de l'ADN double brin par le marqueur fluorescent PicoGreen semble être une alternative plus précise et sensible que la méthode spectrophotométrique du NanoDrop One (104).

Élaboration de qPCR sur les régions 5,8S et ITS

Au cours de cette étude, des qPCR spécifiques des genres *Trichosporon* et *Rhodotorula* ont initialement été élaborées sur les régions 5,8S et ITS.

Afin de réduire les coûts de qPCR liés aux réactifs, des amorces et sondes panfongiques ciblant la région 5,8S ont été élaborées pour les *mix* Tri2 ITS, Rho2 ITS et Rho3 ITS, la spécificité ne se faisant que par l'intermédiaire d'une seule amorce. Cependant, ces *mix* ont présenté différentes réactions croisées, notamment sur le genre *Candida* (Tableau 20 et 21). En comparaison aux autres genres fongiques tels que les basidiomycètes, nous n'avons pas trouvé d'explication sur l'amplification prépondérante des espèces du genre *Candida*.

Malgré l'utilisation d'amorces et sondes spécifiques sur la région ITS2, le *mix* Tri1 ITS présentait une amplification de *C. albicans*, *C. krusei* et *C. parapsilosis* (Tableau 20). En modifiant les paramètres par défaut du logiciel *Primer-BLAST*, nous avons mis en évidence que les amorces sens et anti-sens présentaient une complémentarité partielle avec des régions chromosomiques différentes de la région ITS2 pour *C. albicans* et *C. tropicalis* (Annexe 7). À la suite de ces observations, nous préconisons de modifier les paramètres par défaut du logiciel *Primer-BLAST* dans le but d'évaluer informatiquement la spécificité des amorces et sondes sur les espèces fongiques qui seront utilisées au cours des tests de réactions croisées.

Des accroches non spécifiques d'espèces n'appartenant pas au genre *Trichosporon*, avec une complémentarité sur l'ensemble des nucléotides des amorces de la région cible, ont été indiquées par le logiciel *Primer-BLAST* (Annexe 4). En analysant ces accroches non spécifiques, et en les comparant avec d'autres séquences GenBank, nous avons observé que ces résultats correspondaient à des erreurs d'affiliation dans la base NCBI.

Malgré l'utilisation de *Primer-BLAST* par une large communauté scientifique pour l'élaboration de qPCR, cet outil informatique présente des inconvénients pour la recherche d'homologie sur les séquences fongiques non ciblées par les amorces et

sondes. De nouvelles solutions informatiques tel que le logiciel MRPrimerW, utilisé sur les gènes humains et murins, semblent intéressantes pour concevoir des amorces spécifiques (105).

Les amorces ont été élaborées afin d'obtenir un T_m proche de 55°C. Cette température était incompatible avec l'usage de protocoles d'amplification standards basés sur une température d'hybridation de 60°C. Cependant, les températures d'hybridation basses sont associées à un risque plus accru d'amplification non spécifique (106).

Les essais de gamme d'amorces ont démontré une absence de dimères d'amorces pour le *mix* Rho1 ITS. Ces résultats sont concordants avec les données obtenues *in silico* (Annexe 4).

Parmi les 4 autres *mix*, le *mix* Tri1 ITS se distinguait par la concentration plus importante en dimères d'amorces. Ces résultats n'étaient pas prévisibles par les données calculées par le logiciel *OligoAnalyzer Tool*.

La présence de dimères d'amorces est un des facteurs d'une efficacité faible de qPCR (107). La plus faible efficacité de la qPCR Tri1 ITS comparée à celle de la qPCR Tri2 ITS peut s'expliquer par une forte proportion de dimères d'amorces (Figure 30).

Des essais ont été réalisés afin d'étudier l'effet du *master mix* et de la température d'hybridation sur les efficacités de qPCR.

Le *master mix* Agilent présentait la meilleure efficacité comparée à celles des *master mix* Applied (Tableau 18). L'étude de Dellière *et al.* a mis en évidence une différence de C_q en fonction du *master mix* utilisé pour la détection de l'ADN de *P. jirovecii*. La précocité de C_q pourrait s'expliquer par une meilleure efficacité de la qPCR (108).

La température d'hybridation de qPCR ne présentait pas d'influence sur la précocité de C_q . Malgré une efficacité supérieure à 62°C pour les *mix* Tri1, Tri2 et Rho2 ITS comparée à 54°C (Tableau 19), nous avons observé une nette diminution de l'intensité de fluorescence à des températures d'hybridation élevées (Figure 33). La variabilité d'efficacité et de fluorescence de qPCR sur un large gradient de température démontre une robustesse limitée de ces différentes *mix* (109).

Le *mix* Rho1 ITS était le seul qui ne présentait pas de réactions croisées. Cependant, ce *mix* était celui qui présentait la plus faible efficacité (E = 80,31 %).

L'absence de réactions croisées peut être expliquée par la faible efficacité de ce *mix*. Malgré l'utilisation d'une gamme de concentration de MgCl₂, aucune différence d'efficacité et d'aspect des courbes d'amplification n'a été observée (Figure 34) (110).

Élaboration de qPCR sur les régions 28S et IGS1

De nouvelles amorces ont été élaborées sur les régions 28S et IGS1 du fait de résultats insatisfaisants sur les premières régions utilisées. Ces régions sont usuellement utilisées pour l'identification d'espèce des genres *Rhodotorula* et *Trichosporon* par séquençage (7).

Des études antérieures ont démontré l'intérêt de l'utilisation de nucléotides dégénérés pour la détection de plusieurs espèces au sein d'un complexe fongique (111). Les régions IGS étant très hétérogènes selon les espèces, des nucléotides dégénérés ont été utilisés afin que la qPCR Tri1 IGS soit spécifique du genre *Trichosporon* (Tableau 11 et Annexe 3).

Afin de pouvoir utiliser une température d'hybridation d'environ 60°C, des sondes MGB ont été développées. La fraction MGB 3', en se liant au sillon mineur, stabilise le complexe sonde/cible pour augmenter le T_m de la sonde et permettre la conception de sondes plus courtes (112). Cette plus grande stabilité augmente également la spécificité de la qPCR. Bien que l'augmentation du T_m d'une sonde MGB soit difficilement prédictible, elle semble dépendre du pourcentage de nucléotides A-T (112).

Sur la base des résultats obtenus au cours des expériences précédentes, nous avons évalué les réactions croisées en amont des autres paramètres analytiques.

Le *mix* Tri1 IGS présentait des réactions croisées à différentes températures d'hybridation sur les trois isolats de *R. mucilaginosa*. L'amplification était plus précoce pour les extraits les plus concentrés (Tableau 23). Les *mix* Tri2 IGS et T.asa3 IGS présentaient des amplifications croisées aléatoires, que ce soit lors de répliquats au sein d'un même essai ou au cours d'essais différents (Tableau 24 et 25). Ces amplifications aléatoires nous ont amené à envisager l'hypothèse de contaminations.

Afin d'identifier la source de ces possibles contaminations, plusieurs tâches ont été réalisées pour la qPCR Tri2 IGS :

- Reconstitution de nouveaux aliquots d'amorces et de sondes à partir d'un nouveau flacon d'eau qualité PCR,
- Utilisation d'une hotte et de matériel de pipetage différents pour la préparation des *mix* dans le laboratoire de niveau 2 (L2),
- Utilisation d'un PSM (poste de sécurité microbiologique) et de matériel de pipetage différents lors du dépôt des extraits d'ADN,
- Utilisation d'un thermocycleur QS5 différent pour l'étape d'amplification,
- Utilisation de nouvelles subcultures de souches (à partir de bouillon glycérolé) et de nouveaux extraits d'ADN,
- Extraction d'ADN en l'absence de souches de *Trichosporon* spp. dans la même série.

Malgré la réalisation de l'ensemble de ces étapes, aucune diminution des réactions croisées n'a été observée.

Aucune amplification non spécifique n'a été observée au cours des essais de spécificité réalisés en simplicité pour les qPCR Rho1 28S et Rho2 28S (Tableau 26 et essai n°1 Tableau 27). Le *mix* Rho2 28S (E = 96,8 %) présentait une meilleure efficacité comparée à celle de Rho1 28S (E = 91,63 %) à une température d'hybridation de 60°C (Tableau 28). Les essais de réactions croisées sur plusieurs réplicats ont donc été réalisés uniquement avec le *mix* Rho2 28S.

Dès l'essai n°2, des réactions croisées aléatoires ont été observées (Tableau 27). Des amplifications modérément tardives (Cq ≈ 37) de deux puits sur huit (25 %) de l'extrait d'ADN de *C. neoformans* EEQ ont été objectivées au cours de l'essai n° 5. Cependant, aucune amplification n'était observée pour les extraits d'ADN des souches de sérotype A, A/D ou D.

Malgré l'utilisation d'UNG à des températures différentes, des amplifications ont été observées pour 11 puits sur 32 (34,4 %) de l'extrait de *C. neoformans* EEQ. L'UNG est capable de cliver l'uracile présent dans l'ADN, empêchant son utilisation par l'ADN polymérase ou comme cible d'hybridation. Cependant, le *master mix* Agilent utilise de la thymine, rendant inefficace l'UNG envers les amplicons néoformés par l'intermédiaire de ce réactif (113).

Les extraits d'ADN obtenus à partir de nouvelles subcultures ne présentaient plus d'amplification, permettant d'affirmer l'absence de réactions croisées de la qPCR

Rho2 28S sur l'ensemble des souches testées (essais n°5 et 7, Tableau 27). En reprenant *a posteriori* les milieux de culture conservés à + 4°C, des contaminations par *R. mucilaginosa* ont été observées sur les milieux de culture de *T. asahii* (Annexe n°8). Il est possible que les milieux de culture aient été contaminés en amont de l'extraction de l'ADN. Des suspicions de contamination de l'environnement, entraînant des réactions faussement positives, ont également été suspectées dans la littérature avec le test multiplex syndromique cobas® eplex (BCID-FP) (86).

Toutes les étapes de qPCR, de la préparation du *mix* au dépôt des extraits d'ADN, ont été réalisées manuellement. La qPCR étant une technique très sensible, la distribution du *mix* et des extraits d'ADN de façon automatisée permettrait de diminuer les sources de contaminations.

Performances analytiques de la qPCR Rho2 28S

Le *master mix* Agilent présentait une efficacité supérieure à celles des *master mix* Applied et Roche (Tableau 29).

La meilleure efficacité du *master mix* Agilent peut être le reflet de la concentration élevée en MgCl₂ (11 mM), supérieure à celle du *master mix* Roche fixée à 6,4 mM (concentration non renseignée pour le *master mix* Applied).

Néanmoins, une forte concentration en MgCl₂ augmente le risque de réactions croisées (110). D'autres tests de réactions croisées avec les *master mix* Roche ou Applied devraient être réalisés afin d'observer une éventuelle diminution des réactions aléatoires. De plus, ces *master mix* permettraient l'utilisation d'UNG, contrairement à l'Agilent.

La limite de détection de la qPCR Rho2 28S (LoD₉₅) a été estimée à 1 fg/μl sur l'extrait d'ADN de *R. mucilaginosa* (Tableau 30 et Annexe 6). Ce résultat est concordant avec la LoD de la qPCR *Mucorales* réalisée au sein de notre laboratoire (LoD de 0,5 à 1 fg/μl en fonction des espèces).

La répétabilité est excellente avec un coefficient de variation de 0,67 % et 1,16 %, respectivement pour les concentrations de 1 000 fg/μl et 10 fg/μl (Tableau 31). La répétabilité devrait néanmoins être évaluée dans des conditions d'utilisation de routine, c'est à dire avec une distribution automatisée par le système MICROLAB STARlet.

Ces paramètres analytiques de la qPCR Rho2 28S devront être étudiés sur d'autres espèces d'intérêts cliniques telles que *R. glutinis* et *R. minuta*.

La perspective majeure de ce travail sera d'étudier l'intérêt de la qPCR Rho2 28S sur des échantillons cliniques, tels que des prélèvements cutanéophanéériens ou des prélèvements profonds (sang, biopsie, ...).

Du fait de la faible incidence des IFI à *Rhodotorula* spp., des essais sur sang *spiké*, c'est-à-dire additionné d'une quantité connue de levures, seraient nécessaires afin d'étudier l'effet de la matrice (sang total, sérum ou plasma) sur la sensibilité analytique de la qPCR (114).

Enfin, cette nouvelle qPCR *Rhodotorula* spp. pourrait être utilisée sur une cohorte nationale de patients atteints de fongémie à *Rhodotorula* spp. Ce nouvel outil permettrait une meilleure sensibilité et précocité dans le diagnostic de ces IFI.

VI. Conclusion

Les IFI à *Rhodotorula* spp. et *Trichosporon* spp. sont rares mais constituent un véritable défi diagnostique et thérapeutique en raison de la pauvreté des outils diagnostiques actuels, de leur résistance naturelle aux échinocandines et d'un taux de mortalité élevé. La qPCR est une méthode d'analyse de choix : sensible, spécifique et automatisable, elle est de plus en plus développée dans les laboratoires de biologie médicale. À ce jour, aucune qPCR spécifique des genres *Trichosporon* et *Rhodotorula* utilisable sur échantillon clinique n'a été développée. Les essais de spécificité des qPCR ciblant les régions 5,8S et ITS n'ont pas été concluants. De nouvelles amorces et sondes ont été élaborées sur les régions 28S et IGS. Des amplifications aléatoires et hétérogènes ont été observées sur les différentes qPCR *Trichosporon* spp. La qPCR Rho2 28S présentait de bonnes performances analytiques. Il reste toutefois à identifier l'origine des amplifications non spécifiques observées au cours de certains essais. Enfin, la qPCR Rho2 28S devra être étudiée sur des échantillons cliniques afin d'évaluer son intérêt pour le diagnostic d'IFI à *Rhodotorula* spp.

VII. Références bibliographiques

1. Donnelly JP, Chen SC, Kauffman CA, Steinbach WJ, Baddley JW, Verweij PE, et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin Infect Dis*. 12 sept 2020;71(6):1367-76.
2. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised Definitions of Invasive Fungal Disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*. 15 juin 2008;46(12):1813-21.
3. Denning DW. Global incidence and mortality of severe fungal disease. *Lancet Infect Dis*. janv 2024;S1473309923006928.
4. Sati H, Beardsley J, Alastruey-Izquierdo A, Jan-Willem Alffenaar, Morrissey O, Beyer P, et al. WHO fungal priority pathogens list to guide research development and public health. 2022;
5. Pr. Françoise Dromer, Pr. Stéphane Bretagne, Pr. Olivier Lortholary. Rapport d'activité CNRMA2019 publié en mars 2020 [Internet]. Disponible sur: <https://www.pasteur.fr/fr/file/39845/download>
6. Bretagne S, Renaudat C, Desnos-Ollivier M, Sitbon K, Lortholary O, Dromer F, et al. Predisposing factors and outcome of uncommon yeast species-related fungaemia based on an exhaustive surveillance programme (2002–14). *J Antimicrob Chemother*. 1 juin 2017;72(6):1784-93.
7. Chen SCA, Perfect J, Colombo AL, Cornely OA, Groll AH, Seidel D, et al. Global guideline for the diagnosis and management of rare yeast infections: an initiative of the ECMM in cooperation with ISHAM and ASM. *Lancet Infect Dis*. déc 2021;21(12):e375-86.
8. Miceli MH, Díaz JA, Lee SA. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect Dis*. févr 2011;11(2):142-51.
9. Kwon-Chung KJ, Fraser JA, Doering TL, Wang ZA, Janbon G, Idnurm A, et al. *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 1 juill 2014;4(7):a019760-a019760.
10. Menu E, Filori Q, Dufour JC, Ranque S, L'Ollivier C. A Repertoire of the Less Common Clinical Yeasts. *J Fungi*. 11 nov 2023;9(11):1099.

11. Garnaud C, Cornet M. Membrane et paroi fongiques : des rôles clés dans la résistance aux antifongiques. *Rev Francoph Lab.* févr 2020;2020(519):50-8.
12. Maligie MA, Selitrennikoff CP. *Cryptococcus neoformans* Resistance to Echinocandins: (1,3) β -Glucan Synthase Activity Is Sensitive to Echinocandins. *Antimicrob Agents Chemother.* juill 2005;49(7):2851-6.
13. Kalem MC, Subbiah H, Leipheimer J, Glazier VE, Panepinto JC. Puf4 Mediates Post-transcriptional Regulation of Cell Wall Biosynthesis and Caspofungin Resistance in *Cryptococcus neoformans*. Alspaugh JA, éditeur. *mBio.* 23 févr 2021;12(1):e03225-20.
14. Cao C, Xue C. More than flipping the lid: Cdc50 contributes to echinocandin resistance by regulating calcium homeostasis in *Cryptococcus neoformans*. *Microb Cell.* 6 avr 2020;7(4):115-8.
15. Cornely OA, Bassetti M, Calandra T, Garbino J, Kullberg BJ, Lortholary O, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: non-neutropenic adult patients. *Clin Microbiol Infect.* déc 2012;18:19-37.
16. Ullmann AJ, Akova M, Herbrecht R, Viscoli C, Arendrup MC, Arikan-Akdagli S, et al. ESCMID guideline for the diagnosis and management of *Candida* diseases 2012: adults with haematological malignancies and after haematopoietic stem cell transplantation (HCT). *Clin Microbiol Infect.* déc 2012;18:53-67.
17. Virginie Bellet, Sébastien Bertout. Champignon du mois - Septembre 2021 - Société Française de Microbiologie. Société Française de Microbiologie. <https://www.sfm-microbiologie.org/2021/09/13/champignon-du-mois-septembre-2021/>.
18. Vidal JE, Boulware DR. LATERAL FLOW ASSAY FOR CRYPTOCOCCAL ANTIGEN: AN IMPORTANT ADVANCE TO IMPROVE THE CONTINUUM OF HIV CARE AND REDUCE CRYPTOCOCCAL MENINGITIS-RELATED MORTALITY. *Rev Inst Med Trop São Paulo.* sept 2015;57(suppl 19):38-45.
19. Li SS, Mody CH. *Cryptococcus*. *Proc Am Thorac Soc.* 15 mai 2010;7(3):186-96.
20. Alanio A. Dormancy in *Cryptococcus neoformans*: 60 years of accumulating evidence. *J Clin Invest.* 2 juin 2020;130(7):3353-60.
21. Rathore SS, Sathiyamoorthy J, Lalitha C, Ramakrishnan J. A holistic review on *Cryptococcus neoformans*. *Microb Pathog.* mai 2022;166:105521.
22. Chang CC, Harrison TS, Bicanic TA, Chayakulkeeree M, Sorrell TC, Warris A, et al. Global guideline for the diagnosis and management of cryptococcosis: an initiative of the ECMM and ISHAM in cooperation with the ASM. *Lancet Infect Dis.* févr 2024;S1473309923007314.

23. Saunte DML, Gaitanis G, Hay RJ. Malassezia-Associated Skin Diseases, the Use of Diagnostics and Treatment. *Front Cell Infect Microbiol.* 20 mars 2020;10:112.
24. Grice EA, Dawson TL. Host–microbe interactions: Malassezia and human skin. *Curr Opin Microbiol.* déc 2017;40:81-7.
25. Bajwa J. Malassezia species and its significance in canine skin disease. *Can Vet J Rev Veterinaire Can.* janv 2023;64(1):87-90.
26. Guillot J, Bond R. Malassezia Yeasts in Veterinary Dermatology: An Updated Overview. *Front Cell Infect Microbiol.* 28 févr 2020;10:79.
27. Varada S, Dabade T, Loo DS. Uncommon presentations of tinea versicolor. *Dermatol Pract Concept.* 31 juill 2014;93-6.
28. Borelli D, Jacobs PH, Nall L. Tinea versicolor: Epidemiologic, clinical, and therapeutic aspects. *J Am Acad Dermatol.* août 1991;25(2):300-5.
29. Rhimi W, Theelen B, Boekhout T, Otranto D, Cafarchia C. Malassezia spp. Yeasts of Emerging Concern in Fungemia. *Front Cell Infect Microbiol.* 28 juill 2020;10:370.
30. Paul AA, Hoffman KL, Hagan JL, Sampath V, Petrosino JF, Pammi M. Fungal cutaneous microbiome and host determinants in preterm and term neonates. *Pediatr Res.* août 2020;88(2):225-33.
31. Cabañes FJ. Malassezia pachydermatis: To be, or not to be lipid-dependent. *Rev Iberoam Micol.* janv 2020;37(1):3-4.
32. Abdillah A, Ranque S. MalaSelect: A Selective Culture Medium for Malassezia Species. *J Fungi.* 1 oct 2021;7(10):824.
33. Bassaid A, Adjmi-Hamoudi H, Bellahsene Z. Identification des levures du genre Malassezia isolées de patients atteints de pityriasis versicolor. *Ann Dermatol Vénérologie.* déc 2016;143(12):S338-9.
34. Iatta R, Battista M, Miragliotta G, Boekhout T, Otranto D, Cafarchia C. Blood culture procedures and diagnosis of Malassezia furfur bloodstream infections: Strength and weakness. *Med Mycol.* 1 oct 2018;56(7):828-33.
35. Campigotto A, Richardson SE, Sebert M, McElvania TeKippe E, Chakravarty A, Doern CD. Low Utility of Pediatric Isolator Blood Culture System for Detection of Fungemia in Children: a 10-Year Review. Warnock DW, éditeur. *J Clin Microbiol.* sept 2016;54(9):2284-7.
36. Colombo AL, Padovan ACB, Chaves GM. Current Knowledge of Trichosporon spp. and Trichosporonosis. *Clin Microbiol Rev.* oct 2011;24(4):682-700.

37. Li H, Guo M, Wang C, Li Y, Fernandez AM, Ferraro TN, et al. Epidemiological study of *Trichosporon asahii* infections over the past 23 years. *Epidemiol Infect.* 2020;148:e169.
38. National Library of Medicine 8600 Rockville Pike Bethesda, MD 20894. Taxonomy.
39. Francisco EC, De Almeida Junior JN, De Queiroz Telles F, Aquino VR, Mendes AVA, De Andrade Barberino MGM, et al. Species distribution and antifungal susceptibility of 358 *Trichosporon* clinical isolates collected in 24 medical centres. *Clin Microbiol Infect.* juill 2019;25(7):909.e1-909.e5.
40. De Almeida Júnior JN, Hennequin C. Invasive *Trichosporon* Infection: a Systematic Review on a Re-emerging Fungal Pathogen. *Front Microbiol* [Internet]. 17 oct 2016 [cité 9 juill 2024];7. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fmicb.2016.01629/full>
41. Arendrup MC, Boekhout T, Akova M, Meis JF, Cornely OA, Lortholary O. ESCMID and ECMM joint clinical guidelines for the diagnosis and management of rare invasive yeast infections. *Clin Microbiol Infect.* avr 2014;20:76-98.
42. Mokhtari M, Etebarian HR, Mirhendi SH, Razavi M. Identification and phylogeny of some species of the genera *Sporidiobolus* and *Rhodotorula* using analysis of the 5.8s rDNA gene and two ribosomal internal transcribed spacers. *Arch Biol Sci.* 2011;63(1):79-88.
43. Wirth F, Goldani LZ. Epidemiology of *Rhodotorula* : An Emerging Pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis.* 2012;2012:1-7.
44. Gaurav V, Grover C, Das S, Rai G. White Piedra: An Uncommon Superficial Fungal Infection of Hair. *Skin Appendage Disord.* 2022;8(1):34-7.
45. Robles-Tenorio A, Lepe-Moreno KY, Mayorga-Rodríguez J. White Piedra, a Rare Superficial Mycosis: an Update. *Curr Fungal Infect Rep.* sept 2020;14(3):197-202.
46. Kupiec PM, Green AN, Marks KC. Black adherence nodules on the scalp hair shaft. *Cutis.* juill 2017;100(1):14;38;39.
47. Bonifaz A, Tirado-Sánchez A, Araiza J, Rodríguez-Leviz A, Guzmán-Sánchez D, Gutiérrez-Mendoza S, et al. White Piedra: Clinical, Mycological, and Therapeutic Experience of Fourteen Cases. *Skin Appendage Disord.* 2019;5(3):135-41.
48. Tligui H, Oudaina W, El Ftouh S, Madda F, Hesseissen L. Une ulcération cutanée due à *Rhodotorula mucilaginosa* chez un enfant immunodéprimé. *J Mycol Médicale.* mars 2018;28(1):215-7.

49. Coppola R, Zanframundo S, Rinati MV, Carbotti M, Graziano A, Galati G, et al. *Rhodotorula mucilaginosa* skin infection in a patient treated with sorafenib. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. mai 2015;29(5):1028-9.
50. Da Cunha MML, Dos Santos LPB, Dornelas-Ribeiro M, Vermelho AB, Rozental S. Identification, antifungal susceptibility and scanning electron microscopy of a keratinolytic strain of *Rhodotorula mucilaginosa* : a primary causative agent of onychomycosis. *FEMS Immunol Med Microbiol*. avr 2009;55(3):396-403.
51. Kimura M, Asano-Mori Y, Sakoh T, Abe M, Ueno K, Hoshino Y, et al. Factors Associated with Breakthrough Fungemia Caused by *Candida* , *Trichosporon* , or *Fusarium* Species in Patients with Hematological Disorders. *Antimicrob Agents Chemother*. 15 mars 2022;66(3):e02081-21.
52. Kuo SH, Lu PL, Chen YC, Ho MW, Lee CH, Chou CH, et al. The epidemiology, genotypes, antifungal susceptibility of *Trichosporon* species, and the impact of voriconazole on *Trichosporon* fungemia patients. *J Formos Med Assoc*. sept 2021;120(9):1686-94.
53. Ioannou P, Vamvoukaki R, Samonis G. *Rhodotorula* species infections in humans: A systematic review. *Mycoses*. févr 2019;62(2):90-100.
54. Rajmane VS, Rajmane ST, Ghatole MP. *Rhodotorula* species infection in traumatic keratitis — a case report. *Diagn Microbiol Infect Dis*. déc 2011;71(4):428-9.
55. Gonul S, Gedik S, Ozturk BT, Bakbak B, Koktekir BE, Okudan S, et al. Postoperative fungal endophthalmitis caused by *Trichosporon asahii* treated with voriconazole. *Arq Bras Oftalmol*. 2015;78(4):252-4.
56. Clancy CJ, Nguyen MH. Finding the “Missing 50%” of Invasive Candidiasis: How Nonculture Diagnostics Will Improve Understanding of Disease Spectrum and Transform Patient Care. *Clin Infect Dis*. 1 mai 2013;56(9):1284-92.
57. Schell WA, Benton JL, Smith PB, Poore M, Rouse JL, Boles DJ, et al. Evaluation of a digital microfluidic real-time PCR platform to detect DNA of *Candida albicans* in blood. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. sept 2012;31(9):2237-45.
58. Pfeiffer CD, Samsa GP, Schell WA, Reller LB, Perfect JR, Alexander BD. Quantitation of *Candida* CFU in Initial Positive Blood Cultures. *J Clin Microbiol*. août 2011;49(8):2879-83.
59. Kim HA, Hyun M, Ryu SY. Catheter-Associated *Rhodotorula mucilaginosa* Fungemia in an Immunocompetent Host. *Infect Chemother*. 2013;45(3):339.
60. Yu SY, Guo LN, Xiao M, Kudinha T, Kong F, Wang H, et al. *Trichosporon dohaense*, a rare pathogen of human invasive infections, and literature review. *Infect Drug Resist*. sept 2018;Volume 11:1537-47.

61. Albitar-Nehme S, Agosta M, Kowalska AH, Mancinelli L, Onori M, Lucignano B, et al. Case Report: *Trichosporon japonicum* Fungemia in a Pediatric Patient With Refractory Acute B Cell Lymphoblastic Leukemia. *Front Pediatr.* 3 mars 2022;10:861476.
62. Hospenthal DR, Murray CK, Beckius ML, Green JA, Dooley DP. Persistence of Pigment Production by Yeast Isolates Grown on CHROMagar Candida Medium. *J Clin Microbiol.* déc 2002;40(12):4768-70.
63. Nakase K, Suzuki K, Kyo T, Kohara T, Sugawara Y, Katayama N. Is elevation of the serum β -d-glucan level a paradoxical sign for *Trichosporon* fungemia in patients with hematologic disorders? *Int J Infect Dis.* janv 2012;16(1):e2-4.
64. Kitazawa T, Ishigaki S, Seo K, Yoshino Y, Ota Y. Catheter-related bloodstream infection due to *Rhodotorula mucilaginosa* with normal serum (1 \rightarrow 3)- β -D-glucan level. *J Mycol Médicale.* juin 2018;28(2):393-5.
65. Odabasi Z, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, McGinnis MR, Ostrosky-Zeichner L. Differences in beta-glucan levels in culture supernatants of a variety of fungi. *Med Mycol.* janv 2006;44(3):267-72.
66. De Andrade IB, Almeida MDA, Figueiredo-Carvalho MHG, Coelho RA, Chaves ALDS, Frases S, et al. Production of Secreted Carbohydrates that Present Immunologic Similarities with the *Cryptococcus* Glucuronoxylomannan by Members of the *Trichosporonaceae* Family: A Comparative Study Among Species of Clinical Interest. *Mycopathologia.* juin 2021;186(3):377-85.
67. Singh G, Agarwal S, Rani L, Thakur K. Meningitis caused by *Rhodotorula rubra* in an human immunodeficiency virus infected patient. *Indian J Med Microbiol.* 2007;25(2):166.
68. Dornelles G, Araújo GRDS, Rodrigues M, Alves V, Almeida-Paes R, Frases S. Comparative Analysis of Capsular and Secreted Polysaccharides Produced by *Rhodotorula mucilaginosa* and *Cryptococcus neoformans*. *J Fungi.* 20 nov 2023;9(11):1124.
69. IMMY. CrAg® LFA CRYPTOCOCCAL ANTIGEN LATERAL FLOW ASSAY; Product Manua.
70. Fekkar A, Brun S, D'Ussel M, Uzunov M, Cracco C, Dhédin N, et al. Serum Cross-Reactivity with *Aspergillus* Galactomannan and Cryptococcal Antigen during Fatal Disseminated *Trichosporon dermatitis* Infection. *Clin Infect Dis.* nov 2009;49(9):1457-8.
71. Boutin CA, Luong ML. Update on therapeutic approaches for invasive fungal infections in adults. *Ther Adv Infect Dis.* janv 2024;11:20499361231224980.

72. Oliveira Dos Santos C, Zijlstra JG, Porte RJ, Kampinga GA, Van Diepeningen AD, Sinha B, et al. Emerging pan-resistance in *Trichosporon* species: a case report. *BMC Infect Dis.* déc 2016;16(1):148.
73. Liao Y, Lu X, Yang S, Luo Y, Chen Q, Yang R. Epidemiology and Outcome of *Trichosporon* Fungemia: A Review of 185 Reported Cases From 1975 to 2014. *Open Forum Infect Dis.* 1 déc 2015;2(4):ofv141.
74. Gharaghani M, Taghipour S, Zarei Mahmoudabadi A. Molecular identification, biofilm formation and antifungal susceptibility of *Rhodotorula* spp. *Mol Biol Rep.* nov 2020;47(11):8903-9.
75. Gomez-Lopez A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. Susceptibility profile of 29 clinical isolates of *Rhodotorula* spp. and literature review. *J Antimicrob Chemother.* 1 mars 2005;55(3):312-6.
76. Spader TB, Ramírez-Castrillón M, Valente P, Alves SH, Severo LC. In Vitro Interactions of Amphotericin B Combined with Non-antifungal Agents Against *Rhodotorula mucilaginosa* Strains. *Mycopathologia.* févr 2019;184(1):35-43.
77. Potenza L, Chitasombat MN, Klimko N, Bettelli F, Dragonetti G, Del Principe MI, et al. *Rhodotorula* infection in haematological patient: Risk factors and outcome. *Mycoses.* mars 2019;62(3):223-9.
78. Francisco EC, Dieleman C, Hagen F, Colombo AL, *Trichosporon* Brazilian Network, Chaves GM, et al. *In vitro* activity of isavuconazole against clinically relevant *Trichosporon* species: a comparative evaluation of EUCAST broth microdilution and MIC Test Strip methods. *J Antimicrob Chemother.* 2 mars 2023;78(3):817-22.
79. CLSI M27M44S-ED3:2022 appendix B.
80. Elyse Poitras et Alain Houde. La PCR en temps réel: principes et applications. *Rev Biol Biotechnol Maroc Soc Biol Can.* Vol.2, No 2, December 2002. pp.2-11.
81. LA PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL OU LA « TAQMAN ». Généthon, 2001 [Internet]. Disponible sur: <http://www.genethon.fr>
82. PCR - polymerase chain reaction - Home [Internet]. 2001. Disponible sur: : https://www.bag-diagnostics.com/en/technology_pcr.html
83. © Thermo Fisher Scientific. Comparaison entre la PCR en temps réel, la PCR numérique et la PCR classique. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-learning-center/real-time-pcr-basics/real-time-vs-digital-vs-traditional-pcr.html>
84. Biovalley. Mix pour sondes pour RT-qPCR. Disponible sur: <https://www.biovalley.fr/achat/cat-mix-pour-sondes-pour-rt-qpcr-3555.html>

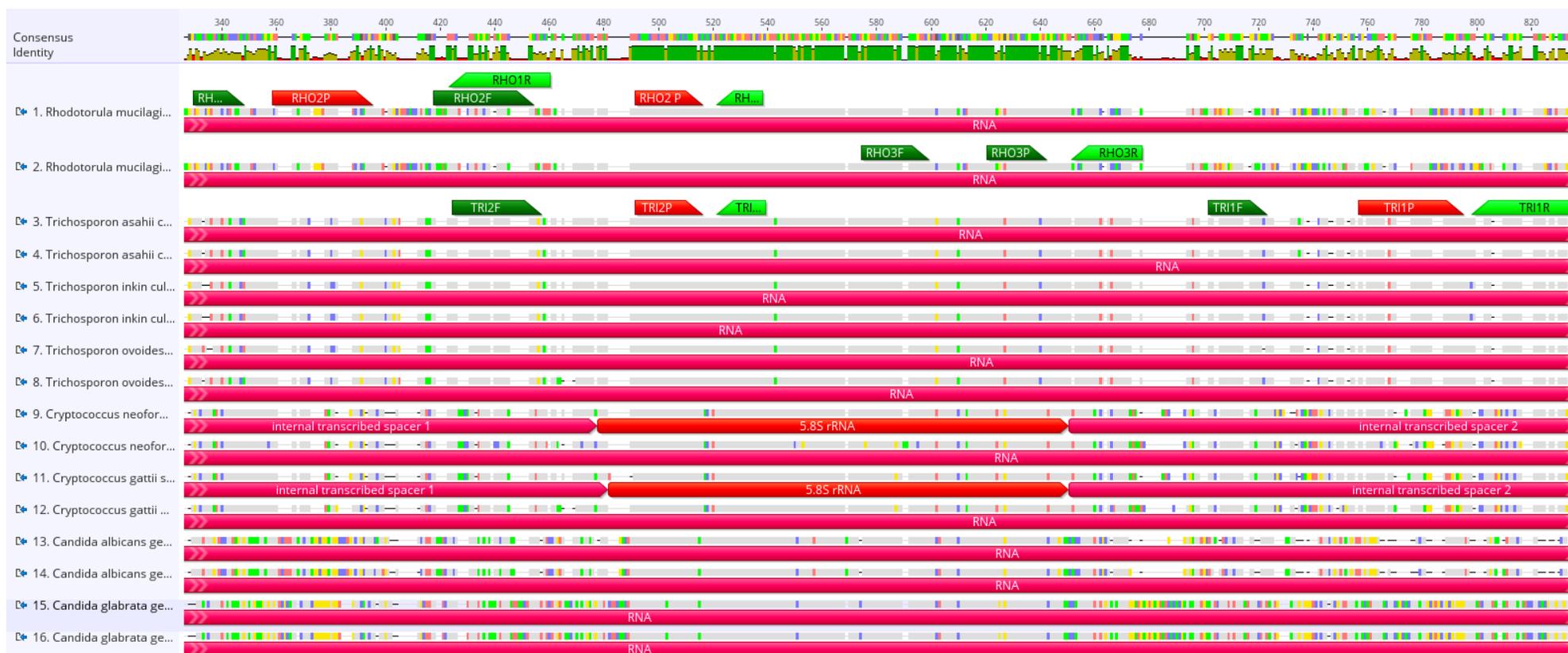
85. BIOSEARCH TECHNOLOGIES. Taq Polymerase: what is it and its applications [Internet]. Disponible sur: <https://blog.biosearchtech.com/thebiosearchtechblog/bid/48174/taq-facts>
86. Hamilton-Seth R, Strega V, Gammel N, Campodónico VL, Simner PJ, Zhang SX, et al. Evaluation of false-positive *Rhodotorula* detections by a multiplex PCR-based fungal panel performed on positive blood culture bottles. McAdam AJ, éditeur. J Clin Microbiol. 8 mai 2024;62(5):e00179-24.
87. Sano M, Sugitani M, Ishige T, Homma T, Kikuchi K, Sunagawa K, et al. Supplemental utility of nested PCR for the pathological diagnosis of disseminated trichosporonosis. Virchows Arch. 5 nov 2007;451(5):929-35.
88. Nagai H, Yamakami Y, Hashimoto A, Tokimatsu I, Nasu M. PCR Detection of DNA Specific for *Trichosporon* Species in Serum of Patients with Disseminated Trichosporonosis. J Clin Microbiol. mars 1999;37(3):694-9.
89. Sugita T, Nakajima M, Ikeda R, Niki Y, Matsushima T, Shinoda T. A Nested PCR Assay to Detect DNA in Sera for the Diagnosis of Deep-Seated Trichosporonosis. Microbiol Immunol. févr 2001;45(2):143-8.
90. Yamagata E, Kamberi P, Yamakami Y, Hashimoto A, Nasu M. Experimental Model of Progressive Disseminated Trichosporonosis in Mice with Latent Trichosporonemia. J Clin Microbiol. 2000;38(9):3260-6.
91. Mekha N, Sugita T, Ikeda R, Nishikawa A, Poonwan N. Real-Time PCR Assay to Detect DNA in Sera for the Diagnosis of Deep-Seated Trichosporonosis. Microbiol Immunol. juin 2007;51(6):633-5.
92. Tsuji Y, Tokimatsu I, Sugita T, Nozaki M, Kobayashi D, Imai K, et al. QUANTITATIVE PCR ASSAY USED TO MONITOR SERUM TRICHOSPORON ASAHII DNA CONCENTRATIONS IN DISSEMINATED TRICHOSPORONOSIS. Pediatr Infect Dis J. nov 2008;27(11):1035-7.
93. Simon E. Mise au point d'une technique de séquençage pour l'identification fongique [Internet]. Sciences pharmaceutiques. 2020; Disponible sur: dumas-03213063f
94. Kuzdraliński A, Kot A, Szczerba H, Nowak M, Muszyńska M. A Review of Conventional PCR Assays for the Detection of Selected Phytopathogens of Wheat. Microb Physiol. 2017;27(3):175-89.
95. Basu C, éditeur. PCR Primer Design [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [cité 17 août 2024]. (Methods in Molecular Biology; vol. 1275). Disponible sur: <https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2365-6>

96. Bio-Rad. TIPS, TRICKS & BEST PRACTICES The Ultimate qPCR Assay Design Guide. Disponible sur: https://www.bio-rad.com/webroot/web/pdf/lsr/literature/Bulletin_6894.pdf
97. Rodríguez A, Rodríguez M, Córdoba JJ, Andrade MJ. Design of Primers and Probes for Quantitative Real-Time PCR Methods. In: Basu C, éditeur. PCR Primer Design [Internet]. New York, NY: Springer New York; 2015 [cité 17 août 2024]. p. 31-56. (Methods in Molecular Biology; vol. 1275). Disponible sur: https://link.springer.com/10.1007/978-1-4939-2365-6_3
98. Broeders S, Huber I, Grohmann L, Berben G, Taverniers I, Mazzara M, et al. Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. Trends Food Sci Technol. juin 2014;37(2):115-26.
99. Anses. Guide de validation des méthodes d'analyses.
100. Bolano A, Stinchi S, Preziosi R, Bistoni F, Allegrucci M, Baldelli F, et al. Rapid methods to extract DNA and RNA from *Cryptococcus neoformans*. FEMS Yeast Res. déc 2001;1(3):221-4.
101. Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. J Clin Microbiol. oct 2005;43(10):5122-8.
102. Simbolo M, Gottardi M, Corbo V, Fassan M, Mafficini A, Malpeli G, et al. DNA qualification workflow for next generation sequencing of histopathological samples. PloS One. 2013;8(6):e62692.
103. Ponti G, Maccaferri M, Manfredini M, Kaleci S, Mandrioli M, Pellacani G, et al. The value of fluorimetry (Qubit) and spectrophotometry (NanoDrop) in the quantification of cell-free DNA (cfDNA) in malignant melanoma and prostate cancer patients. Clin Chim Acta Int J Clin Chem. avr 2018;479:14-9.
104. Ban E, Kim A. PicoGreen assay for nucleic acid quantification - Applications, challenges, and solutions. Anal Biochem. sept 2024;692:115577.
105. Kim H, Kang N, An K, Koo J, Kim MS. MRPrimerW: a tool for rapid design of valid high-quality primers for multiple target qPCR experiments. Nucleic Acids Res. 8 juill 2016;44(W1):W259-66.
106. Prediger E. How to design primers and probes for PCR and qPCR [Internet]. Disponible sur: <https://eu.idtdna.com/pages/education/decoded/article/designing-pcr-primers-and-probes?cSEE>
107. Vallone PM, Butler JM. AutoDimer: a screening tool for primer-dimer and hairpin structures. BioTechniques. août 2004;37(2):226-31.

108. Dellière S, Gits-Muselli M, White PL, Mengoli C, Bretagne S, Alanio A. Quantification of *Pneumocystis jirovecii*: Cross-Platform Comparison of One qPCR Assay with Leading Platforms and Six Master Mixes. *J Fungi*. 26 déc 2019;6(1):9.
109. Bustin S, Huggett J. qPCR primer design revisited. *Biomol Detect Quantif*. déc 2017;14:19-28.
110. Schmidt G, Stiverson J, Angen Ø, Yu Z. Number of PCR Cycles and Magnesium Chloride Concentration Affect Detection of *tet* Genes Encoding Ribosomal Protection Proteins in Swine Manure. *Adv Microbiol*. 2014;04(12):780-7.
111. Bigot J, Godmer A, Prudenté L, Angebault C, Brissot E, Bige N, et al. Diagnosis of mucormycosis using an intercalating dye-based quantitative PCR. *Med Mycol*. 12 mars 2022;60(4):myac015.
112. Kutuyavin IV. 3'-Minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res*. 15 janv 2000;28(2):655-61.
113. Roche. LightCycler® Uracil-DNA Glycosylase User Guide.
114. Ogata K, Matsuda K, Tsuji H, Nomoto K. Sensitive and rapid RT-qPCR quantification of pathogenic *Candida* species in human blood. *J Microbiol Methods*. oct 2015;117:128-35.

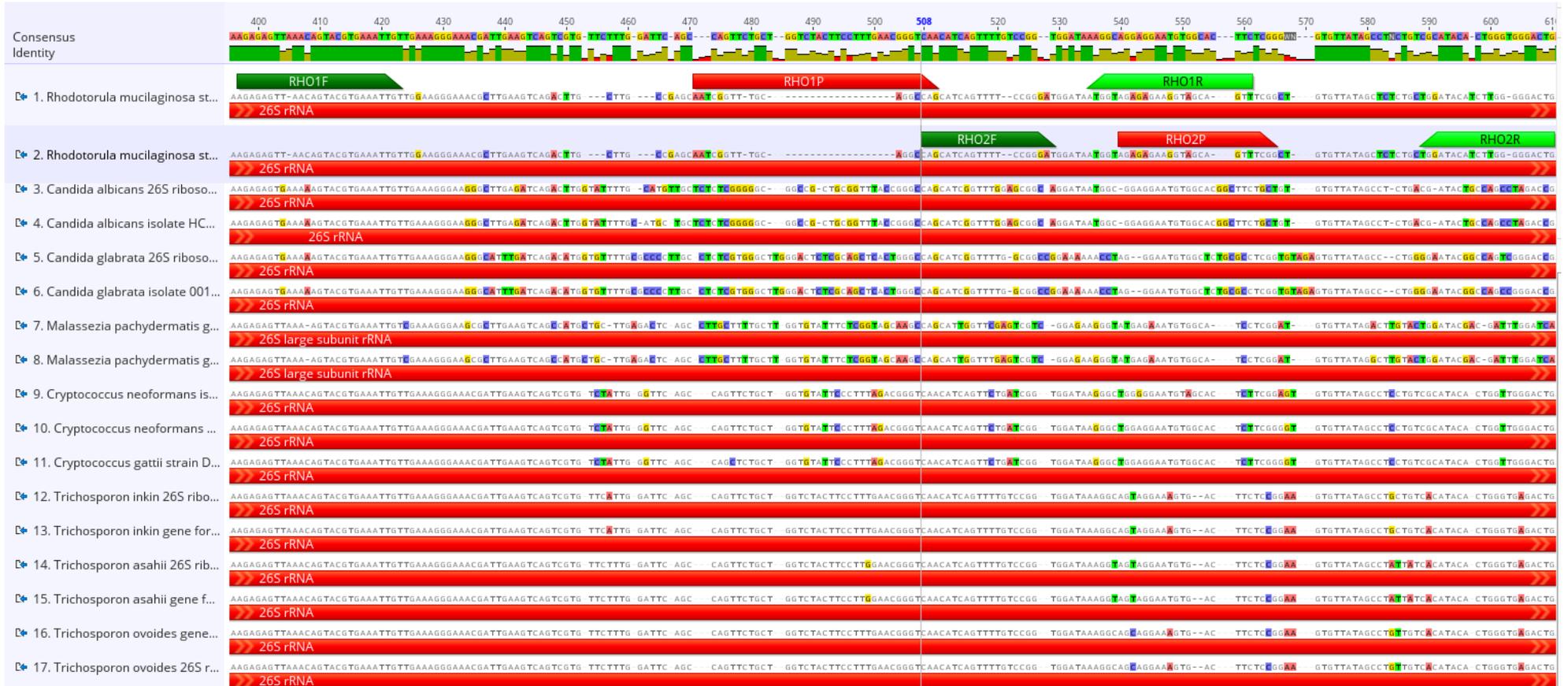
VIII. ANNEXES

ANNEXE 1 : Alignement des séquences 5,8S et ITS pour la conception des qPCR Tri1-2 ITS et Rho1-2-3 ITS.



Les alignements des séquences génomiques ont été réalisés sur le logiciel Geneious Prime version v2023.2. Les numéros d'identification GenBank sont disponibles en Tableau 8.

ANNEXE 2 : Alignement des séquences 28S pour la conception des qPCR Rho1 et Rho2 28S.



Les alignements des séquences génomiques ont été réalisés sur le logiciel Geneious Prime version v2023.2. Les numéros d'identification GenBank sont disponibles en Tableau 8.

ANNEXE 3 : Alignement des séquences *IGS1* pour la conception des qPCR Tri1 et Tri2 IGS et T.asa3



Les alignements des séquences génomiques ont été réalisés sur le logiciel Geneious Prime version v2023.2. Les numéros d'identification GenBank sont disponibles en Tableau 8.

ANNEXE 4 : Tableau résumant les caractéristiques *in silico* des amorces et sondes développées sur les régions 5,8S et ITS.

Nom	F / R / P	Séquences nucléotidiques	pb	Tm (°C)	Tm hairpin (°C)	Tm self-dimer (°C)	Longueur amplicon (pb)	Hairpin min : ΔG (kcal.mole ⁻¹)	Self-dimer : ΔG kcal/mol	Hetero-dimer min : ΔG kcal/mol	Hetero-dimer min : ΔG kcal/mol	Nombre de résultats sur primer-BLAST	Accroches non spécifiques
Tri1 ITS	Tri_F1	GATTGGATTGGGCGTCT	18	55	None	None	88	1,11	-3,61	vs. reverse : -5,02	vs. probe : -9,82	759 Trichosporon spp.	1 <i>Fusarium verticillioides</i> 1 <i>Trichophyton interdigitale</i> 1 <i>Talaromyces pinophilus</i> 1 <i>Malassezia globosa</i> 1 <i>S. cerevisiae</i> 1 <i>Ascomycota</i> sp.
	Tri_R1	GTGAAACTTATTACACCAGACAT	23	54,7	None	None		-0,07	-3,3	vs. forward : -5,02	vs. probe : -8,77		
	Tri_P1	CGCCTTAAAAGAGTTAGCAAGTTTGACA	28	62,7	None	None		-0,72	-4,85	vs. forward : -9,82	vs. reverse : -8,77		
Tri2 ITS	Tri_F2	ACAATGTGTAATGAACGTCGT	21	56,2	None	None	88	0,14	-6,3	vs. reverse : -8,47	vs. probe : -5,47	783 Trichosporon spp.	1 <i>Fusarium verticillioides</i> 1 <i>Trichophyton interdigitale</i> 1 <i>Talaromyces pinophilus</i> 1 <i>Malassezia globosa</i> 1 <i>S. cerevisiae</i> 1 <i>Yarrowia lipolytica</i> 1 <i>Paramicrosphaeropsis</i> sp. 1 <i>Papiliotrema aurea</i> 5 <i>Haglerozyma chiarellii</i>
	Fong_R2	GCTGCGTTCTTCATCGAT	18	55,6	None	None		-0,66	-9,71	vs. forward : -8,47	vs. probe : -6,9		
	Fong_P2	ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT	25	62,9	None	None		0,18	-4,62	vs. forward : 5,47	vs. reverse : -6,9		
Rho1 ITS	Rho_F1	AGTCCGAACCTCTCACTTC	19	54,2	None	None	91	0,33	-3,61	vs. reverse : -4,52	vs. probe : -5,19	724 Rhodotorula spp., dont 635 <i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1 <i>Chondrophycus</i> sp. 10 <i>Rhodospordiobolus</i> sp. 1 <i>Rhynchogastrema coronatum</i>
	Rho_R1	TTTAATACATTCATAGACTTTGTGTT	26	54	None	None		-0,05	-4,85	vs. forward : -4,52	vs. probe : -3,3		
	Rho_P1	CACCTTGTGGGATAGTAACTCTCGC	26	61,8	None	None		0,21	-3,61	vs. forward : -5,19	vs. reverse : -3,3		
Rho2 ITS	Rho_F2	CTTATAAACACAAAGTCTATGAATGT	26	54,2	None	None	97	0,14	7,29	vs. reverse : -6,95	vs. probe : -6,83	934 Rhodotorula spp., dont 705 <i>mucilaginosa</i>	1 <i>Aspergillus brasiliensis</i> 1 uncultured <i>Microbotryomycetes</i> 1 <i>Chondrophycus</i> sp. 1 <i>Rhodospordiobolus ruineniae</i> 1 <i>Rhynchogastrema coronatum</i> 16 <i>Rhodospordiobolus</i> sp. 5 <i>Ustilentyloma graminis</i>
	Fong_R2	GCTGCGTTCTTCATCGAT	18	55,6	None	None		-0,66	-9,71	vs. forward : -6,95	vs. probe : -6,9		
	Fong_P2	ACTTTCAACAACGGATCTCTTGGCT	25	62,9	None	None		0,18	-4,62	vs. forward : -6,83	vs. reverse : -6,9		
Rho3 ITS	Fong_F3	GTGAATCATCGAATCTTTGAACG	23	56,6	None	None	96	0,22	-6,76	vs. reverse : -7,06	vs. probe : -4,95	117 Rhodotorula spp., dont 84 <i>mucilaginosa</i>	1 <i>Sporobolomyces</i> sp.
	Rho_R3	AGAAAGAGGAGGGTTGAAGTA	21	55,6	None	None		1,91	-1,94	vs. forward : -7,06	vs. probe : 4,67		
	Rho_P3	CCGTGGAGCATGCCTGTTTGAG	22	64,2	None	15,7		0,05	-11,66	vs. forward : 4,95	vs. reverse : 4,67		

Les cases jaunes représentent les éléments ne respectant pas le cahier des charges suivi pour la conception des amorces et des sondes (Tableau 9). Les cases vertes représentent les espèces dont les séquences GenBank correspondent à des erreurs d'affiliation dans la base NCBI.

ANNEXE 5 : Tableau résumant les caractéristiques *in silico* des amorces et sondes développées sur les régions 28S et IGS.

Nom	F / R / P	Séquences nucléotidiques	pb	Tm (°C)	Tm hairpin (°C)	Tm self-dimer (°C)	Longueur amplicon (pb)	Hairpin min : ΔG (kcal.mole ⁻¹)	Self-dimer : ΔG kcal/mol	Hetero-dimer min : ΔG kcal/mol	Hetero-dimer min : ΔG kcal/mol	Nombre de résultats sur primer-BLAST	Accroches non spécifiques
Tri1 IGS	Tri IGS_F1	TGTAAGCAGTAGAGTAGCCTTGT	23	58,9	None	None	89	0,09	-3,54	vs. reverse : -6,61	vs. probe : -9,41	459 Trichosporon spp.	1 <i>Mastigias papua</i> 1 <i>Catostylus mosaicus</i> 1 <i>Hygrocybe punicea</i> 1 <i>Spongilla lacustris</i> 1 <i>Vanrija pseudolonga</i>
	Tri IGS_R1	CCAADCATAGAGAGTCCAAAAGGA	24	58	None	None		0,08	-4,64	vs. forward : -6,61	vs. probe : -9,39		
	Tri IGS_P1	CAGGCTCAGCTYTTGTTCTACAGA	23	69,9	None	None		-0,46	-6,34	vs. forward : -9,41	vs. reverse : -9,39		
Tri2 IGS	Tri IGS_F2	TGTAAGCAGTAGAGTAGCCTTGTG	25	60,6	None	None	107	-0,25	3,54	vs. reverse : -3,14	vs. probe : -5,48	431 Trichosporon spp.	1 <i>Mastigias papua</i> 1 <i>Catostylus mosaicus</i> 1 <i>Hygrocybe punicea</i> 1 <i>Spongilla lacustris</i> 1 <i>Carassius carassius</i> 1 <i>Cyprinus carpio</i>
	Tri IGS_R2	GTCGCCCCAGTCCAT	17	61,1	None	None		1,75	-3,61	vs. forward : -3,14	vs. probe : -5,02		
	Tri IGS_P2	TTGTTCTACAGATTGTCCTTTTGG	25	58	38,8	None		-1,2	-3,3	vs. forward : 5,48	vs. reverse : -5,02		
Rho1 28S	Rho28S_F1	AGAGAGTTAACAGTACGTGAAATTGT	26	58,8	None	None	128	-0,8	-7,57	vs. reverse : -6,67	vs. probe : -3,89	981 Rhodotorula spp., dont 754 Rhodotorula mucilaginosa	1 <i>Saccharomyces pastorianus</i> 1 <i>Pseudozyma alboarmeniaca</i> 6 <i>Rhodospordiobolus</i> sp. 1 <i>Sporobolomyces alborubescens</i>
	Rho28S_R1	AACTGCTACCTTCTCTACCAT	23	58,4	None	None		2,21	-3,14	vs. forward : -6,67	vs. probe : -6,69		
	Rho28S_P1	AATCGGTTTGCAGGCCAG	18	58,3	None	None		-0,46	-6,34	vs. forward : -3,89	vs. reverse : -6,69		
Rho2 28S	Rho28S_F2	CAGCATCAGTTTTCCGGGAT	20	58,2	None	None	92	0,62	-9,75	vs. reverse : -7,71	vs. probe : -6,68	969 Rhodotorula spp., dont 867 mucilaginosa	1 <i>Saccharomyces pastorianus</i> 7 unidentified genomic 5 <i>Rhodospordiobolus</i> sp. 1 <i>Pseudozyma siamensis</i> 1 <i>Kwoniella mangrovensis</i> 1 <i>Phenoliferia</i> sp.
	Rho28S_R2	CAGTCCCAAGATGTATCCA	21	58,9	None	None		0,08	-3,05	vs. forward : -7,71	vs. probe : -3,9		
	Rho28S_P2	AGAGAGAAGGTAGCAGTTCCGG	22	59,5	None	None		-0,46	-6,34	vs. forward : -6,68	vs. reverse : -3,9		
T.asa IGS	T.asa_F3	TGAGGTCTCGATGTGAAGTCA	21	58,5	None	None	138	0,02	-6,76	vs reverse : -5,25	vs probe : -7,58	513 <i>T.asahii</i>	2 <i>Lepeophtheirus salmonis</i> strain IoA-00
	T.asa_R3	CTCTTGAAGGACACACTAG	22	58,1	None	None		-0,1	-4,16	vs forward : -5,25	vs probe : -8,57		
	T.asa_P3	TGCAAAGACCAAGTATGAGTGC	22	59,2	None	None		-0,68	-7,05	vs forward : 7,58	vs reverse : 8,57		

Les cases jaunes représentent les éléments ne respectant pas le cahier des charges suivi pour la conception des amorces et des sondes (Tableau 9).

ANNEXE 6 : LoD₉₅ de la qPCR Rho2 28S

ADN ng/µl	CQ1	CQ2	CQ3	CQ4	CQ5	CQ6	CQ7	CQ8	CQ9	CQ10	CQ11	CQ12	CQ13	CQ14	CQ15	CQ16	CQ17	CQ18	CQ19	CQ20	Fréquence de détection	Nombre de répliquats	Cq moyen	Ecart type
1	15,03	14,97																			100%	2	15,00	0,04
0,1	17,55	17,56																			100%	2	17,55	0,01
0,01	20,53	20,83																			100%	2	20,68	0,21
0,001	25,30	25,03	25,11	25,26	25,11	25,49															100%	6	25,22	0,17
0,0001	29,68																				100%	1		
10 ⁻⁵	34,30	33,81	35,34	34,29	35,04	34,12	35,20	34,25	34,03	33,95	34,29	34,62	34,53	33,72	35,28	34,13	34,31	34,63	34,42	34,63	100%	20	34,44	0,47
10 ⁻⁶	34,14	35,42	34,98	38,28	36,28	35,09	36,02	33,88	35,57	35,86	35,27	35,42	36,42	35,12	35,63	34,67	34,98	35,20	36,07	35,23	100%	20	35,48	0,92
10 ⁻⁷	nd	nd	nd	37,69	nd	43,85	nd	36,85	nd	37,60	37,31	37,72	nd	nd	nd	nd	37,78	37,58	nd	35	45%	20	37,93	2,39
10 ⁻⁸	nd	0%	20																					
0	nd	nd																			0%	2		

Cq, quantification cycle ; nd, not detected

ANNEXE 7 : Recherche de spécificité *in silico* sur le logiciel *Primer-BLAST* .

>CP047872.1 *Candida tropicalis* strain MYA-3404 chromosome 4

product length = 3632
 Forward primer 1 GATTGGATTGGGCGTCT 18
 Template 1183215 T.....AAT.A. 1183198

Reverse primer 1 GTGAAACTTATTACACCAGACAT 23
 Template 1179584 .A.....AA.A...A.A.. 1179606

>CP032013.1 *Candida albicans* strain TIMM 1768 chromosome 2

product length = 3514
 Forward primer 1 GATTGGATTGGGCGTCT 18
 Template 583974 AG.....T.T....G 583991

Reverse primer 1 GTGAAACTTATTACACCAGACAT 23
 Template 587487 .CA.....AG.....A.A.. 587465

>CP025159.1 *Candida albicans* strain SC5314-P0 chromosome 2B

product length = 3530
 Forward primer 1 GATTGGATTGGGCGTCT 18
 Template 1660422 AG.....T.T....G 1660405

Reverse primer 1 GTGAAACTTATTACACCAGACAT 23
 Template 1656893 .CA.....AG.....A.A.. 1656915

A

B

Exclusion Exclude predicted Refseq transcripts (accession with XM, XR prefix) Exclude uncultured/

Organism

Enter an organism name (or organism group name such as enterobacteriaceae, rodents), taxonomic ID, or accession number

Entrez query (optional)

Primer specificity stringency
 Primer must have at least total mismatches to unintended targets, including at least mismatches within the last bps at the 3' end.

Ignore targets that have or more mismatches to the primer.

Max target amplicon size

Allow splice variants Allow primer to amplify mRNA splice variants (requires refseq mRNA sequence as PCR template)

Show results in a new window Use new graphic view

(A) résultats de réactions croisées sur des espèces de *Candida* spp. pour les amorces de la qPCR *Tri1* ITS, (B) paramètres de recherche limités à l'organisme « *Candida* » en acceptant un grand nombre de mésappariements de bases

ANNEXE 8 : Photographie de la souche *T. asahii* n°1 contaminée par *R. mucilaginosa* sur gélose Sabouraud

Photo Chloë Lemaire



Université de Lille
UFR3S-Pharmacie
DIPLOME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2023/2024

Nom : LEMAIRE
Prénom : Chloë

Titre de la thèse : Développement et validation d'une qPCR *Trichosporon* spp. et *Rhodotorula* spp. Un nouvel outil pour le diagnostic d'infections fongiques invasives rares.

Mots-clés : *Trichosporon*, *Rhodotorula*, qPCR, PCR en temps réel

Résumé : Au cours des dernières décennies, l'incidence des infections fongiques invasives (IFI) à levures rares a augmenté, en particulier chez les patients immunodéprimés. En raison des faibles données épidémiologiques, cliniques et biologiques, le diagnostic de ces infections reste difficile. Le diagnostic des IFI à *Trichosporon* spp. et *Rhodotorula* spp. est un véritable défi biologique devant l'absence de tests sensibles et spécifiques. L'objectif de cette étude était de développer et d'optimiser deux qPCR spécifiques de *Trichosporon* spp. et *Rhodotorula* spp. Des amorces et sondes ont été développées *in silico* en ciblant initialement les régions 5,8S et ITS, puis les régions 28S et IGS, de l'ARN ribosomique. Des souches fongiques ont été extraites afin d'évaluer les performances analytiques de ces qPCR. Des amplifications aléatoires et non spécifiques ont été détectées au cours des essais de réactions croisées pour la qPCR *Trichosporon* spp. Malgré la présence d'amplifications aléatoires, la spécificité de la qPCR *Rhodotorula* spp. ciblant la région 28S a pu être confirmée. L'efficacité et la LoD de cette qPCR étaient respectivement de 96,8 % et de 1 fg/µl. Le coefficient de variation moyen de la répétabilité était de 0,91 %. Les perspectives de l'étude seraient d'identifier la source des amplifications aléatoires et d'étudier l'intérêt de la qPCR *Rhodotorula* spp. sur des échantillons cliniques tels que des prélèvements cutané-phanériens ou des prélèvements profonds (sang, biopsie, ...).

Membres du jury :

Président : Monsieur le Professeur Thierry BROUSSEAU

Assesseurs : Madame le Docteur Fanny VUOTTO
Madame le Docteur Marjorie CORNU
Monsieur le Professeur Alexandre ALANIO

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Camille CORDIER