LIÈGE université
Faculté de Médecine
Département des sciences biomédicales et précliniques

Évaluation du **séquençage** à haut débit du **génome** pour le **typage moléculaire** et la **distinction** des **dermatophytes** du complexe *Trichophyton mentagrophytes / interdigitale / indotineae*

Présenté par Khalid **EL MOUSSAOUI**

Master en sciences **BIOMÉDICALES**

Année académique **2021 - 2022**

Encadré et supervisé par le Docteur Rosalie **SACHELI** et le Professeur Marie-Pierre **HAYETTE**

Evaluation of high-throughput **genome sequencing** for **molecular typing** and **distinction** of **dermatophytes** of the *Trichophyton mentagrophytes / interdigitale / indotineae* complex

Promotrice

Rosalie **Sacheli**

Co-promotrice

Marie-Pierre **Hayette**

Membres du jury

Sébastien **Bontems**
Marc **Hanikenne**
Christophe **Poulet**

Modérateurs

Rachelle **Franzen**
Olivier **Peulen**


七転心八起去
Sept fois à terre, huit fois debout
Proverbe japonais vantant les mérites de la persévérance.

La pratique usuelle veut que l'étudiant signe le fruit de son labeur de son seul nom, comme s'il s'était suffi à lui-même pour mener à terme son projet de recherche. Me concernant, c'est très loin d'être le cas. Heureusement, cette page de remerciements est là pour rétablir la vérité. En préambule de ce mémoire, j'aimerai donc remercier toutes les personnes qui y ont contribué de près ou de loin et sans qui ce travail n'aurait jamais pu voir le jour.

Pour commencer, je remercie le Professeur Marie-Pierre Hayette qui m'a chaleureusement accueilli au sein du service de microbiologie du CHU de Liège. En ces temps difficiles, une simple conversation avec vous au détour d'un couloir a suffi à me démontrer qu'il n'y a pas que les virus qui se propagent : la passion aussi. Merci de m'avoir transmis votre passion pour les germes atypiques, en particulier pour les champignons. J'espère que ce mémoire sera à la hauteur de vos attentes.

Je tiens également à remercier le Docteur Rosalie Sacheli pour sa confiance, sa bienveillance et son suivi irréprochable. Vos précieux conseils m'ont éclairés durant ce long voyage qui ne se serait jamais achevé sans votre implication. Les mots me manquent pour vous témoigner toute l'admiration et la gratitude que j'éprouve à votre égard.

Je remercie également toute l'équipe du centre national de référence pour les mycoses de Liège : Rajae, Sabrina, Caro et Quentin. Merci pour tous les bons moments passés ensemble. Merci pour l'ambiance chaleureuse. Merci de m'avoir redonné un peu de joie les jours sans. Travailler à vos côtés a été d'un réel enrichissement pour moi. Rajae, merci pour les 1001 astuces que tu as partagé avec moi. Sabrina, il n'y a pas eu un seul jour (littéralement) où tu n'as pas été là pour moi et mes nombreuses questions. Merci de m'avoir accompagné dans les moments difficiles. Je remercie également Nathalie et Seti pour toutes ces longues années d'amitié.

Je remercie les membres du jury pour le temps qu'ils auront accordé à la lecture de ce travail.

J'aimerais remercier Françoise Toussaint (et non, je n'ai pas oublié ma promesse Françoise) pour m'avoir cédé le bain-marie de la séro un nombre incalculable de fois.

Je tiens également à remercier tous les membres du service de microbiologie du CHU de Liège : Stéphanie, Bernadette, Laurent, Chantal, Hafida, Sandrine et tous les autres.

Papa, Maman, et les petits moches, merci pour votre soutien sans failles. Aussi loin que je puisse me souvenir, vous avez été à mes côtés à chaque difficulté que la vie à posé sur mon chemin. On dit souvent qu'on ne choisit pas sa famille... Si j'avais dû le faire, je vous aurais choisi mille fois. Enfin, j'aimerai dédier ce travail à mon petit frère Mohamed, qui a veillé sur moi tout au long de ma vie. Sache qu'il ne se passe pas un seul jour sans que je ne pense à toi. J'espère que tu seras fier de moi tout là-haut...

El mouyaoui Khalid

TABLE DES **MATIERES**

1. INTRODUCTION 01

1.1. Généralités sur les dermatophytes 02
1.1.1. Origine et évolution du parasitisme 02
1.1.2. Modes de transmission 02
1.1.3. Phases du processus d'infection 02

1.2. Taxinomie 03
1.2.1. Taxinomie des dermatophytes 03

1.3. Manifestations cliniques 04
1.3.1. Dermatophytoses de la peau glabre et des ongles 04
1.3.2. Dermatophytoses du cuir chevelu 04
1.3.3. Dermatophytoses atypiques 05

1.4. Distribution des dermatophytes en Europe 05

1.5. Méthodes de diagnostic 05
1.5.1. Prélèvement et anamnèse du patient 06
1.5.2. Examen direct du prélèvement 06
1.5.3. Examen macroscopique de la culture 06
1.5.4. Examen microscopique de la culture 07
1.5.5. Examen du profil moléculaire par spectrométrie de masse 07
1.5.6. Examen du profil génétique par biologie moléculaire 08
1.5.6.1. Séquençage de première génération 08
1.5.6.2. Séquençage de deuxième génération 08
1.5.6.3. Séquençage de troisième génération 09

1.6. Traitements antifongiques 10
1.6.1. Terbinafine 10
1.6.2. Itraconazole et fluconazole 10
1.6.3. Griséofulvine 10
1.6.4. Ciclopirox 11
1.6.5. Amorolfine 11
1.6.6. Thérapie photodynamique 11
1.6.7. Autres thérapies prometteuses 11

1.7. Mécanismes de résistance aux antifongiques 12
1.7.1. Détermination de la sensibilité antifongique 12
1.7.2. Résistance à la terbinafine 12
1.7.3. Résistance aux dérivés azolés 12
1.7.4. Résistances croisées 12

2. OBJECTIFS ET STRATÉGIE EXPÉRIMENTALE 13

2.1. Contexte et objectifs de l'étude 13

2.1.1. Contexte de l'étude 13
2.1.2. Objectif principal de l'étude 13
2.1.3. Objectifs secondaires de l'étude 13

2.2. Stratégie expérimentale 14

3. MATÉRIEL ET MÉTHODES 15

3.1. MATÉRIEL 15

3.1.1. Dermatophytes sélectionnés pour l'étude 15

3.1.2. Matériel de laboratoire et appareillages 15

3.1.3. Logiciels et matériel informatique 17

3.2. *WET-LAB WORKFLOW* 19

3.2.1. Mise en culture des souches étudiées 19

3.2.2. Screening du profil de résistance à la terbinafine 20

3.2.3. Antifongigramme EUCAST E.Def. 11.0 21

3.2.4. Mise au point de l'extraction de l'ADN 22

3.2.4.1. Kit Macherey-Nagel NucleoSpin™ Blood QuickPure 22
3.2.4.2. Kit Qiagen DNEasy™ UltraClean Microbial 22
3.2.4.3. Comparaison du rendement d'extraction 23

3.2.5. Caractérisation par séquençage du segment ITS2 23

3.2.5.1. Amplification du segment ITS2 23
3.2.5.2. Électrophorèse sur gel d'agarose 24
3.2.5.3. Séquençage du segment ITS2 selon la méthode Sanger 24

3.2.6. Séquençage à haut débit du génome 24

3.3. *DRY-LAB WORKFLOW* 24

3.3.1. Configuration de l'environnement de travail 29

3.3.2. Analyse des données de l'antifongigramme 29

3.3.3. Analyse de la séquence du segment ITS2 29

3.3.4. Contrôle des données du NGS 25

3.3.4.1. Contrôle de l'intégrité des données (hash md5) 25
3.3.4.2. Contrôle de la qualité des données 25

3.3.5. Mise au point de la stratégie d'assemblage 26
3.3.6. Analyse des marqueurs moléculaires 27
3.3.7. Classification des souches étudiées 28
3.3.7.1. Approches phylogénomiques 28
3.3.7.2. Approches phylogénétiques 28
3.3.7.3. Mesure de la performance des approches 29

4. RÉSULTATS 30

4.1. Mise en culture des souches de dermatophytes 30
4.2. Screening du profil de résistance à la terbinafine 30
4.3. Antifongigramme EUCAST E.Def. 11.0 30
4.4. Mise au point de l'extraction de l'ADN 30
4.5. Caractérisation par séquençage du segment ITS2 32
4.6. Contrôle des données du NGS 32
4.6.1. Contrôle de contamination 32
4.6.2. Contrôle des scores de qualité 34
4.7. Mise au point de la stratégie d'assemblage 34
4.8. Analyse des marqueurs moléculaires 36
4.8.1. Analyse du gène de la squalène époxydase 36
4.9. Classification des souches étudiées 38
4.9.1. Approche phylogénomique par construction de dendrogramme 38
4.9.2. Approche phylogénomique par mesure d'ANI 35
4.9.3. Approche phylogénétique : 01 | ITS1 | WI 36
4.9.4. Approche phylogénétique : 02 | ITS2 | WI 37
4.9.5. Approche phylogénétique : 03 | ITS1 | NCBI 37
4.9.6. Approche phylogénétique : 04 | ITS2 | NCBI 37
4.9.7. Approche phylogénétique : 05 | TEF1a | NCBI 37
4.9.8. Approche phylogénétique : 06 | ITS1 | MLT 37
4.9.9. Approche phylogénétique : 07 | ITS2 | MLT 31
4.9.10. Approche phylogénétique : 08 | TEF1a | MLT 31

5. DISCUSSION 40

5.1. Mise en culture 40
5.2. Détection des souches résistantes à la terbinafine 40
5.3. Extraction de l'ADN 41
5.4. Séquençage du génome 42
5.5. Analyse des marqueurs 44

5.6. Identification des espèces 45
5.7. Concordance entre les résultats du screening et ceux de l'identification.....46

6. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....47

6.1. Conclusions.....47
6.2. Perspectives 47

7. BIBLIOGRAPHIE 48

TABLE DES **ABREVIATIONS**

ABC	*ATP-binding cassette*
ADN	Acide désoxyribonucléique
ANI	*Average nucleotide identity*
ARN	Acide ribonucléique
ARN$_r$	ARN ribosomique
ATP	Adénosine triphosphate
BCCM	*Belgian coordinated collections of microorganisms*
BLAST	*Basic local alignment search tool*
BLASTn	*Nucleotide BLAST*
CHU	Centre hospitalier universitaire
CISC	*Complex instruction set computer*
CLSI	*Clinical and laboratory standards institute*
CMI	Concentration minimale inhibitrice
CNRML	Centre national de référence pour les mycoses de Liège
DB	*Data base*
ddNTP	Didésoxyribonucléotide
dNTP	Désoxyribonucléotide
EUCAST	*European committee on antimicrobial susceptibility testing*
FC	*Flow cell*
GPU	*Graphics processing unit*
HIV	*Human immunodeficiency virus*
ID	Identification
IDE	*Integrated Development Environment*
ISHAM	*International society for human and animal mycology*
IHEM	*Mycology laboratory of the institute of hygiene and epidemiology*
iTOL	*iTree of life*
ITS	*Internal transcribed spacer*
LSU	*Large ribosomal subunit*
macOS	*Macintosh operating system*
MAFFT	*Multiple alignment using fast Fourier transform*
MALDI-TOF MS	*Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*
MD5	*Message-digest algorithm*
MFS	*Major facilitator superfamily*
MLT	*Maximum likelihood tree*
NCBI	*National center for biotechnology information*
NGS	*Next generation sequencing*

OS	*Operating system*
PAS	*Periodic acid Schiff*
PCR	*Polymerase chain reaction*
PDA	*Potato dextrose agar*
PS	Agent photosensibilisant
RISC	*Reduced instruction set computer*
RPMI	*Roswell Park Memorial Institute*
SARS-CoV-2	*Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2*
SCBM	Secteur commun de biologie moléculaire
SGC2	Sabouraud gentamicine chloramphénicol agar
SNP	*Single nucleotide polymorphism*
SQLE	Squalène époxydase
tBLASTn	*Translated nucleotide BLAST using a protein query*
TCAM	*Terbinafine containing agar medium*
TCEP	*Tris(2-carboxyethyl)phosphine*
TEF1a	*Elongation factor 1-alpha*
UICPA	Union internationale de chimie pure et appliquée
UNIX	*Uniplexed information and computing service*
USD	*United States dollar*
WGS	*Whole genome sequencing*
WGST	*WGS typer*
WSL	*Windows subsystem for linux*
WI	*Westerdijk Institute*

TABLE DES **FIGURES**

1

FIGURE 1.01 Arbre phylogénétique universel du vivant p. **01**
FIGURE 1.02 Structure et développement d'une moisissure p. **01**
FIGURE 1.03 Schématisation de l'*internal transcribed spacer* (ITS) p. **02**
FIGURE 1.04 Représentation de la proximité génomique des dermatophytes du genre *Trichophyton* p. **02**
FIGURE 1.05 Classification actuelle des dermatophytes p. **03**
FIGURE 1.06 Formes cliniques de l'onychomycose p. **04**
FIGURE 1.07 Aspects cliniques des lésions causées par *T. indotineae* p. **04**
FIGURE 1.08 Aspect des lésions d'un *tinea corporis* p. **04**
FIGURE 1.09 Examen à la lampe de Wood positif p. **04**
FIGURE 1.10 Lésions d'un *tinea capitis* p. **04**
FIGURE 1.11 Types de parasitisme pilaire p. **05**
FIGURE 1.12 Distribution des dermatophytes en Europe p. **05**
FIGURE 1.13 Distribution des dermatophytes en Belgique p. **05**
FIGURE 1.14 Morphologie schématique du *T. interdigitale* p. **06**
FIGURE 1.15 Morphologie des *T. interdigitale* CCF 4825, 4822, 4823 et ME1269 p. **06**
FIGURE 1.16 Morphologie schématique du *T. mentagrophytes* p. **07**
FIGURE 1.17 Morphologie du *T. mentagrophytes* CBS 120357 p. **07**
FIGURE 1.18 Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF p. **07**
FIGURE 1.19 Séquençage selon la méthode de Sanger et Coulson automatisée par ordinateur p. **08**
FIGURE 1.20 Structure des adaptateurs Illumina utilisés p. **08**
FIGURE 1.21 Représentation schématique d'un transposome p. **08**
FIGURE 1.22 Principe de la tagmentation p. **09**
FIGURE 1.23 Création des *clusters* sur le support de séquençage p. **09**
FIGURE 1.24 Principe du séquençage par terminateurs réversibles p. **09**
FIGURE 1.25 Principe du séquençage selon la méthode Nanopore p. **10**
FIGURE 1.26 Biosynthèse de l'ergostérol et cibles enzymatiques p. **10**
FIGURE 1.27 Structure de la terbinafine p. **11**
FIGURE 1.28 Structure du fluconazole p. **11**
FIGURE 1.29 Structure de l'itraconazole p. **11**
FIGURE 1.30 Structure de la griséofulvine p. **11**
FIGURE 1.31 Structure du ciclopirox p. **11**
FIGURE 1.32 Structure de l'amorolfine p. **11**
FIGURE 1.33 Principe de la thérapie photodynamique p. **11**
FIGURE 1.34 Distribution mondiale des mutations de la squalène époxydase p. **12**

2

FIGURE 2.01 Schématisation des principales étapes du *wet-lab workflow* p. **14**

FIGURE 2.02 Schématisation des principales étapes du *dry-lab workflow* p. **14**

3

FIGURE 3.01 Répartition des souches sélectionnées p. **15**

FIGURE 3.02 Géloses Sabouraud inoculées p. **19**

FIGURE 3.03 Flux de travail pour l'inoculation des souches de dermatophytes étudiées p. **19**

FIGURE 3.04 Configuration de la plaque pour la méthode de dilution p. **20**

FIGURE 3.05 Configuration de la plaque pour la méthode de microdilution p. **20**

FIGURE 3.06 Calendrier d'inoculation des souches de dermatophytes p. **22**

FIGURE 3.07 Paramètres utilisés pour l'amplification de la région ITS2 p. **23**

FIGURE 3.08 Marqueur N0467S p. **23**

FIGURE 3.09 Evolution de l'absorbance pour la terbinafine p. **24**

FIGURE 3.10 Structure du format fastq p. **25**

FIGURE 3.11 Signification du score de qualité Phred (Q) p. **26**

FIGURE 3.12 Principe de l'épreuve de correction des *reads* p. **26**

FIGURE 3.13 Principe de l'assemblage *de novo* p. **26**

FIGURE 3.14 Interface graphique de WGS Typer p. **27**

FIGURE 3.15 Exemple de graphique obtenu pour l'analyse de la performance p. **29**

4

FIGURE 4.01 Répartition attendue des 61 souches de dermatophytes étudiées. p. **30**

FIGURE 4.02 Répartition des souches selon leur sensibilité à la terbinafine p. **30**

FIGURE 4.03 Résultat de la sélection aléatoire p. **30**

FIGURE 4.04 Comparaison du rendement d'extraction en fonction du kit utilisé p. **31**

FIGURE 4.05 Évolution de la puissance statistique en fonction de la taille de l'échantillon p. **31**

FIGURE 4.06 Différence entre profondeur et recouvrement de séquençage p. **32**

FIGURE 4.07 Profondeur de séquençage pour la souche KE005 p. **32**

FIGURE 4.08 Statistiques des fichiers générés par le NGS p. **32**

FIGURE 4.09 Distribution du %GC des *reads* pour les souches de l'étude p. **32**

FIGURE 4.10 Distribution du %GC des *reads* pour la souche KE017 p. **33**

FIGURE 4.11 Analyse de contamination de la souche KE017 avec Kraken2 p. **33**

FIGURE 4.12 Détails du *cluster* de contamination de l'analyse Kraken2 p. **33**

FIGURE 4.13 Évaluation du score de qualité par position p. **33**

FIGURE 4.14 Évaluation du score de qualité moyen par *read* p. **33**

FIGURE 4.15 Analyse des marqueurs sur WGS Typer p. **34**

FIGURE 4.16 Distribution du profil moléculaire des souches analysées p. **34**
FIGURE 4.17 Analyse manuelle du gène SQLE par tBLASTn p. **34**
FIGURE 4.18 Alignement des séquences SQLE *wildtype* et SQLE (KE028) p. **34**
FIGURE 4.19 Nouvelle distribution de l'échantillon étudié p. **34**
FIGURE 4.20 Classification des dermatophytes par l'approche PHYL | WGST p. **35**
FIGURE 4.21 Origines de prélèvement (clade *T. mentagrophytes*) p. **35**
FIGURE 4.22 Origines de prélèvement (clade *T. interdigitale*) p. **35**
FIGURE 4.23 Origines de prélèvement (clade *T. indotineae*) p. **35**
FIGURE 4.24 Performance de l'ID par l'approche PHYL | ANI p. **35**
FIGURE 4.25 Classification des dermatophytes par l'approche PHYL | ANI p. **36**
FIGURE 4.26 Alignement multiple des séquences ITS1 des dermatophytes étudiés p. **36**
FIGURE 4.27 Gros plan sur la position 127 des séquences ITS1 p. **36**
FIGURE 4.28 Alignement multiple des séquences ITS2 des dermatophytes étudiés p. **36**
FIGURE 4.29 Gros plan sur la position 51 des séquences ITS2 p. **36**
FIGURE 4.30 Classification des dermatophytes par l'approche 01 | ITS1 | WI p. **37**
FIGURE 4.31 Performance de l'ID par l'approche 01 | ITS1 | WI p. **37**
FIGURE 4.32 Classification des dermatophytes par l'approche 02 | ITS2 | WI p. **37**
FIGURE 4.33 Performance de l'ID par l'approche 02 | ITS2 | WI p. **37**
FIGURE 4.34 Performance de l'ID par l'approche 03 | ITS1 | NCBI p. **37**
FIGURE 4.35 Classification des dermatophytes par l'approche 03 | ITS1 | NCBI p. **38**
FIGURE 4.36 Classification des dermatophytes par l'approche 04 | ITS2 | NCBI p. **38**
FIGURE 4.37 Performance de l'ID par l'approche 04 | ITS2 | NCBI p. **38**
FIGURE 4.38 Classification des dermatophytes par l'approche 05 | TEF1a | NCBI p. **38**
FIGURE 4.39 Performance de l'ID par l'approche 05 | TEF1a | NCBI p. **38**
FIGURE 4.40 Classification des dermatophytes par l'approche 06 | ITS1 | MLT p. **38**
FIGURE 4.41 Performance de l'ID par l'approche 06 | ITS1 | MLT p. **38**
FIGURE 4.42 Classification des dermatophytes par l'approche 07 | ITS2 | MLT p. **39**
FIGURE 4.43 Performance de l'ID par l'approche 07 | ITS2 | MLT p. **39**
FIGURE 4.44 Classification des dermatophytes par l'approche 08 | TEF1a | MLT p. **39**
FIGURE 4.45 Performance de l'ID par l'approche 08 | TEF1a | MLT p. **39**

5

FIGURE 5.01 Évolution du coût de séquençage par génome au cours des 20 dernières années p. **43**
FIGURE 5.02 Orientation de l'identification selon les informations cliniques du patient p. **45**

TABLE DES **TABLEAUX**

1

TABLEAU 1A	Principaux traitements antifongiques et leurs mécanismes d'action	p. **10**
TABLEAU 1B	Transporteurs impliqués dans la résistance aux dérivés azolés	p. **12**

3

TABLEAU 3A	Liste exhaustive du petit matériel de laboratoire utilisé	p. **15**
TABLEAU 3B	Liste exhaustive des consommables de laboratoire utilisés	p. **15**
TABLEAU 3C	Liste exhaustive des milieux de culture prêts à l'emploi utilisés	p. **15**
TABLEAU 3D	Liste exhaustive des appareillages utilisés	p. **16**
TABLEAU 3E	Liste exhaustive des réactifs utilisés	p. **16**
TABLEAU 3F	Liste exhaustive des kits d'extraction et de purification de l'ADN utilisés	p. **16**
TABLEAU 3G	Liste exhaustive des kits divers utilisés	p. **16**
TABLEAU 3H	Liste exhaustive des amorces utilisées	p. **16**
TABLEAU 3I	Liste exhaustive des enzymes utilisées	p. **16**
TABLEAU 3J	Liste exhaustive des logiciels, paquets et services utilisés	p. **17**
TABLEAU 3K	Liste exhaustive des génomes de référence utilisés	p. **18**
TABLEAU 3L	Liste exhaustive des séquences de référence utilisées	p. **18**
TABLEAU 3M	Mix (1 échantillon)	p. **23**
TABLEAU 3N	*Breakpoints* utilisés pour les espèces *T. mentagrophytes / interdigitale / indotineae*	p. **24**
TABLEAU 3O	Stratégies explorées pour l'assemblage du génome	p. **27**
TABLEAU 3P	Métriques utilisées pour l'évaluation des assemblages obtenus	p. **27**
TABLEAU 3Q	Méthodes d'extraction des séquences	p. **28**
TABLEAU 3R	Approches d'identification étudiées	p. **28**
TABLEAU 3S	Paramètres de RAxML GUI	p. **29**

4

TABLEAU 4A	CMI obtenues par la méthode de microdilution pour les souches résistantes	p. **30**
TABLEAU 4B	Comparaison des rendements d'extraction de l'ADN entre le kit NucleoSpin et le kit DNEasy	p. **31**
TABLEAU 4C	Analyse de la distribution des données au sein des 2 groupes formés selon le kit d'extraction	p. **32**
TABLEAU 4D	Comparaison des 6 assemblages obtenus grâce à l'outil d'évaluation QUAST	p. **32**
TABLEAU 4E	Profil majoritaire des souches de dermatophytes étudiées	p. **33**
TABLEAU 4F	Concordance entre le *screening* et l'analyse génotypique par WGST	p. **33**
TABLEAU 4G	Comparaison des résultats obtenus selon les 10 méthodes d'identification testées	p. **39**

TABLE DES **LIENS EXTERNES**

3

QR 01	Inventaire des souches	p. **15**
QR 02	Préparation et utilisation des plaques de *screening* à la terbinafine	p. **20**
QR 03	Protocole pour détermination des CMI selon la méthode EUCAST E.DEF 11.0	p. **21**
QR 04	Extraction de l'ADN grâce au kit Macherey-Nagel NucleoSpin	p. **21**
QR 05	Extraction de l'ADN grâce au kit Qiagen DNEasy	p. **21**
QR 06	Script python pour la fonction de sélection aléatoire	p. **22**
QR 07	Script R pour la comparaison des rendements d'extraction de l'ADN	p. **22**
QR 08	Configuration de l'environnement informatique	p. **24**
QR 09	Modèle de classeur pour analyse EUCAST E.DEF 11.0	p. **24**
QR 10	Base de données du Westerdijk Institute	p. **24**
QR 11	Script python pour le contrôle de l'intégrité des données post-transfert	p. **25**
QR 12	Flux de travail pour le contrôle de la qualité des données du NGS	p. **26**
QR 13	Protocole bio-informatique pour la mise au point de la stratégie d'assemblage	p. **26**

4

QR14	Classeurs pour les résultats de l'antifongigramme EUCAST E.DEF 11.0	p. **30**
QR15	Données brutes pour l'extraction de l'ADN	p. **31**
QR16	Données brutes pour l'analyse du gène SQLE par tBLASTn	p. **33**
QR17	Données brutes pour l'approche PHYL | ANI	p. **35**

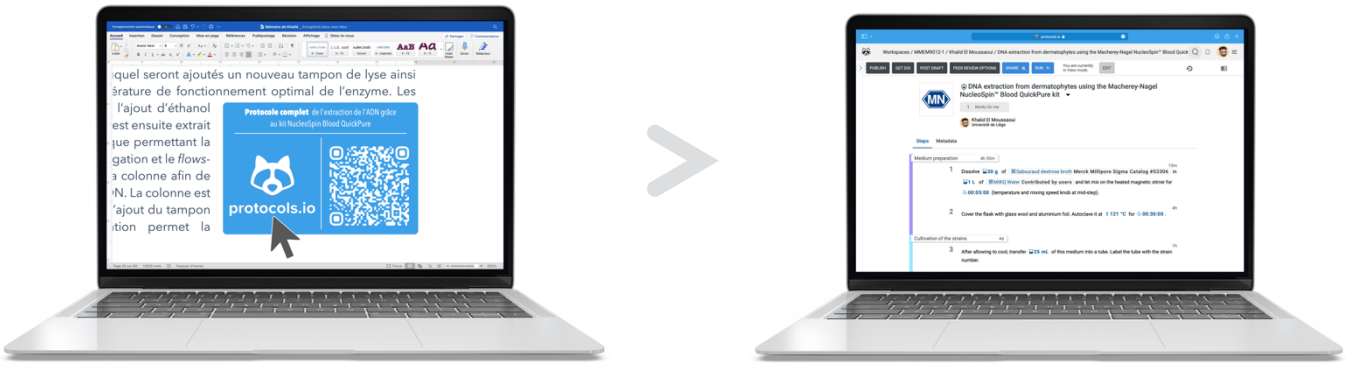
MISSIONS DU CNRML

Ce travail de fin d'étude a été réalisé au sein du laboratoire de microbiologie clinique (CHU de Liège) et, plus précisément, au centre national de référence des mycoses de Liège (CNRML). Ce laboratoire a pour mission principale l'expertise microbiologique des mycoses superficielles et profondes provenant de divers laboratoires à travers le pays. L'identification des souches fongiques qui lui sont adressées permet ainsi de confirmer le diagnostic établi et ce, jusqu'au niveau de l'espèce. Si nécessaire, une détermination de la sensibilité *in vitro* aux antifongiques adaptés peut être réalisée, y compris suivant la méthode de référence EUCAST. Par ailleurs, dans un contexte d'épidémie, il incombe aux centres nationaux de référence d'offrir aux autorités sanitaires un support quant à la caractérisation phénotypique et génotypique des souches impliquées (*Sacheli & Hayette, 2018*).

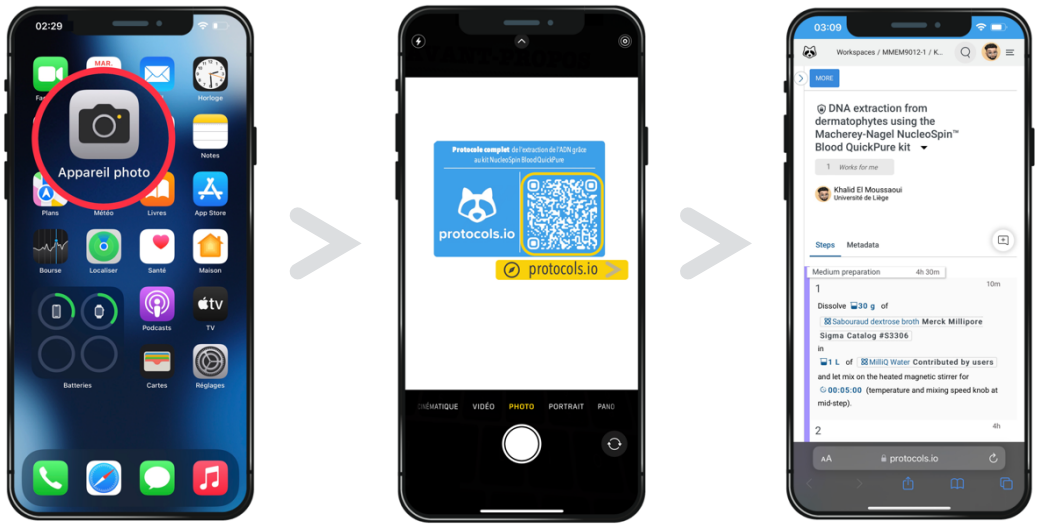
Le système jusqu'alors utilisé pour effectuer le typage moléculaire des dermatophytes est le Diversilab® commercialisé par bioMérieux, un système basé sur la *repetitive element palindromic PCR* (rep-PCR). Néanmoins, à la suite d'un arrêt de commercialisation, le CNRML a dû trouver une nouvelle solution pour effectuer le typage moléculaire des dermatophytes. L'équipe s'est ainsi tournée vers le *whole genome sequencing* (WGS). Très en vogue actuellement, cette technique présente néanmoins quelques inconvénients. Parmi ceux-ci figure la nécessité d'une forte expertise bio-informatique afin d'interpréter les données qui sont générées. Pour pallier ce problème, le CNRML a fait appel à une *spin-off* de l'Université de Liège : Hedera-22. Spécialisée dans la découverte *in silico* de molécules naturelles, cette *spin-off* a développé un logiciel tout-en-un capable d'analyser les données issues du séquençage, ouvrant la porte à quiconque souhaite traiter ses données sans aucune compétence bio-informatique particulière. La préoccupation actuelle du CNRML est donc de s'approprier et mettre au point cette nouvelle approche afin d'effectuer, entre autres, le typage moléculaire des souches de dermatophytes qui lui sont adressées. C'est au sein de cette lignée que s'inscrit ce travail de fin d'études.

RESSOURCES **NUMÉRIQUES**

En quête d'exhaustivité quant à la méthodologie expérimentale, des ressources externes sont présentes dans certains points des sections « matériel et méthodes » et « résultats ». Selon les cas, il peut s'agir d'un protocole externe, d'un script informatique intégrant du code source ou encore d'un tableur interactif. La nature de ces ressources ne permettant pas de les intégrer physiquement sur papier, il a été jugé pertinent de n'intégrer qu'un lien pointant vers la plateforme hébergeant la ressource en question. Si le lecteur possède une version électronique de ce document, il suffit de cliquer sur le logo de la plateforme qui héberge la ressource, une fenêtre navigateur s'ouvre et la ressource s'affiche à l'écran.



En format papier, il est possible d'accéder à la ressource externe grâce à n'importe quel smartphone. Pour cela, il faut ouvrir l'application « appareil photo » et pointer l'objectif vers le QR-code imprimé. Un pop-up signale qu'un lien vient d'être lu. En touchant sur ce pop-up, une fenêtre navigateur s'ouvre et la ressource numérique s'affiche à l'écran. Dans tous les cas, chacune de ces ressources est téléchargeable individuellement. Concernant la version électronique de ce document, celle-ci est accessible aux membres de l'Université de Liège via la plateforme MatheO.



INTRODUCTION

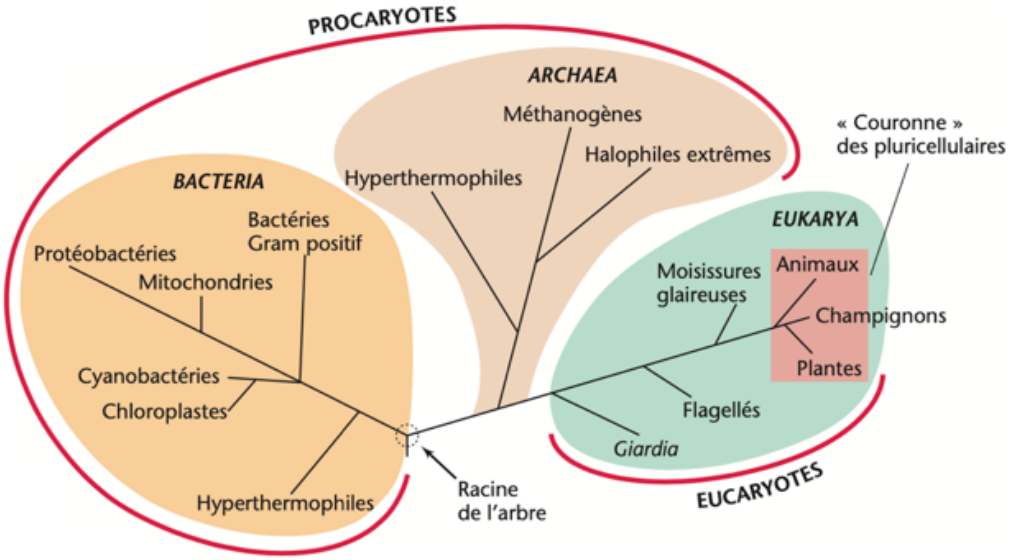


FIGURE 1.01. Arbre phylogénétique universel du vivant

L'arbre est défini à partir des comparaisons de séquences de l'ADN ribosomal. La première observation qui peut être effectuée à ce stade est la proximité des règnes des champignons et des animaux. Cette similarité est à l'origine de bien des maux en thérapie antifongique, où les alternatives thérapeutiques sont très limitées par rapport aux thérapies antibactériennes.

SOURCE : Madigan et al., 2007

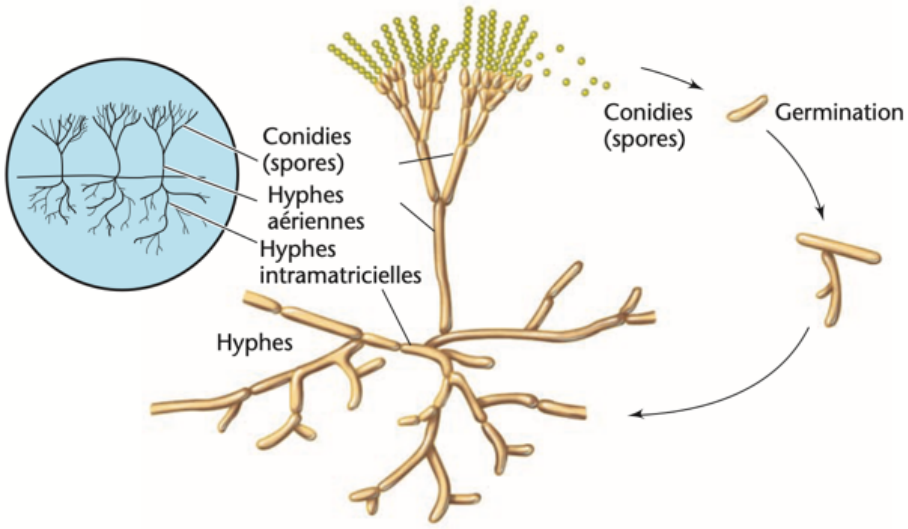


FIGURE 1.02. Structure et développement d'une moisissure

Les conidies (aussi appelées spores) permettent la dissémination du champignon par l'intermédiaires d'animaux ou simplement en étant transporté par l'air.

SOURCE : Madigan et al., 2007

Les champignons (également appelés mycètes) sont des organismes uni- ou pluricellulaires eucaryotes présents dans l'environnement, dans la flore animale mais également dans la flore humaine. Tandis que certains sont macroscopiques (macromycètes), d'autres sont visibles uniquement au microscope (micromycètes). Au sein du vivant, ils forment un groupe phylogénétique homogène et ce, peu importe si leur classification est basée sur l'ADN ribosomal ou sur d'autres gènes (**FIGURE 1.01**). Structurellement parlant, ils sont pourvus d'une paroi rigide, composée à 90% de polysaccharides associés à des protéines, des lipides, des polyphosphates et des ions inorganiques. Ce polysaccharide est dans la majorité des cas de la chitine, un polymère de N-acetylglucosamine. Chez certains champignons, la chitine est remplacée par d'autres polysaccharides, notamment les chitosanes, manannes et galactosanes. Sous cette paroi réside une membrane plasmique riche en stérols. Il est aujourd'hui dénombré plus de 100 000 espèces de champignons, mais moins de 0,5% d'entre eux sont pathogènes. En effet, il existe des champignons dont les effets sont bénéfiques (c'est le cas du mycobiome, ou encore des champignons qui composent la levure de boulanger, utilisée pour fermenter le pain lors du processus de panification) ou à l'inverse, des champignons dont les effets sont délétères (c'est le cas des moisissures qui envahissent les habitations en cas d'humidité élevée). Les infections causées par la faible part des champignons qui s'avèrent pathogènes sont appelées mycoses. Certaines sont superficielles (les dermatophytoses, entre autres) tandis que d'autres sont profondes (les aspergilloses invasives, entre autres). À l'échelle mondiale, certaines de ces mycoses ont une prévalence très élevée (les candidoses ou encore les dermatophytoses) tandis que d'autres sont très rarement détectées. Les micromycètes sont à leur tour subdivisés en plusieurs sous-catégories : les champignons filamenteux, les champignons levuriformes, les champignons dimorphiques et enfin, les dermatophytes. Les champignons filamenteux (aussi appelés moisissures) ont la caractéristique de s'étendre grâce à un système de filaments qu'il convient d'appeler thalle (ou mycélium). Ce mycélium représente l'ensemble du réseau formé par des filaments individuels, qu'il convient d'appeler hyphes. Ces dernières peuvent être cloisonnées ou à l'inverse, ne former qu'une seule entité (**FIGURE 1.02**). Parmi les champignons filamenteux figurent les moisissures environnementales du genre *Aspergillus* qui sont des pathogènes opportunistes, profitant de l'affaiblissement du système immunitaire pour se développer. La seconde catégorie est celle des champignons levuriformes, qui sont pourvus de thalles unicellulaires de forme ovalaire. Ces dernières peuvent donner naissance, dans certains cas, à un pseudo mycélium. Dans cette catégorie figurent les levures du genre *Candida* ou encore celles du genre *Cryptococcus*. La troisième catégorie est celle des champignons dimorphiques qui, comme l'indique leur appellation, adoptent une morphologie différente à l'état saprophytique et parasitaire. Ces derniers adoptent une morphologie de type champignon filamenteux lorsqu'ils sont cultivés *in vitro*, mais adoptent une morphologie de type levure lorsqu'ils se développent *in vivo* chez l'hôte (*ANOFEL, 2016*). Les champignons appartenant à cette catégorie sont rarement isolés en Europe centrale. En pratique, certains champignons sont inclassables sur base de cette classification à 3 catégories. C'est le cas notamment de *Pneumocystis jirovecii*, qui fut longtemps considéré à tort comme étant un protozoaire et qui, dorénavant, se retrouve classé dans une catégorie de champignons atypiques (*Stringer et al., 2002*). Enfin, la dernière catégorie est celle des dermatophytes, pathogènes obligatoires qui causent, dans la majorité des cas, des mycoses superficielles de la peau et des phanères.

1.1. Généralités sur les dermatophytes

Comme explicité dans le point précédent, les dermatophytes sont un groupe de champignons filamenteux. Ils appartiennent à l'embranchement des *Ascomycota*, à la classe des Ascomycètes, à l'ordre des *Onygénales* et à la famille des *Arthrodermataceae*. Les dermatophytes produisent une enzyme, la kératinase, qui est capable de dégrader la kératine. Cette caractéristique leur permet d'infecter les tissus kératinisés tels que les cheveux, la peau ou les ongles. Selon leur habitat naturel, les dermatophytes sont classés en 3 groupes (*Ghannoum et Isham, 2009*). Le premier groupe est celui des dermatophytes telluriques, saprophytes du sol qui sont généralement inoffensifs tant pour l'homme que l'animal (à l'exception de *N. gypsea*). Le second groupe est celui des dermatophytes anthropophiles, dont l'hôte exclusif est l'Homme. Ce groupe comprend par exemple le *Trichophyton tonsurans*, le *Trichophyton soudanense*, le *Trichophyton interdigitale, le Microsporum audouinii* ou encore le *Trichophyton rubrum*. Pour finir, le dernier groupe est celui des dermatophytes zoophiles, dont l'hôte est généralement l'animal mais qui, sous certaines conditions, peuvent être transmis à l'homme. Ce groupe comprend notamment *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton benhamiae,* ou encore *Microsporum canis* (*De Hoog et al., 2016*).

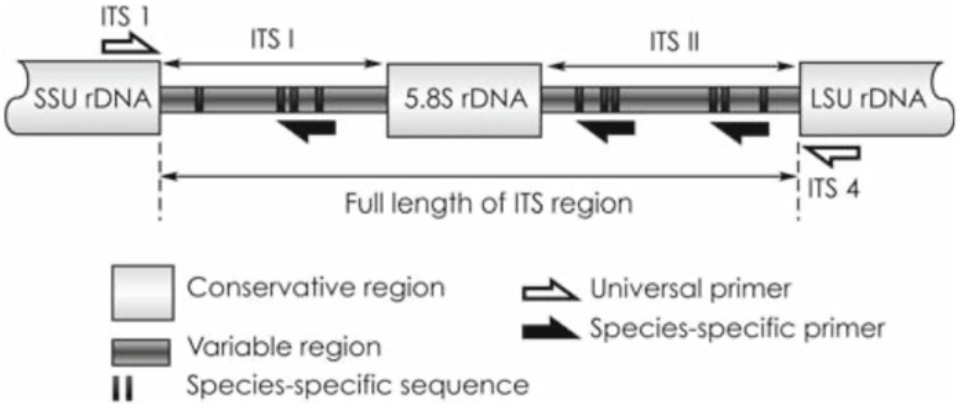


FIGURE 1.03. Schématisation de l'*Internal Transcribed Spacer* (ITS)

Cette région est située entre la petite (18S) et la grande (28S) sous-unité ribosomale. Elle est elle-même subdivisée en 2 parties : l'ITS1 est situé entre les sous-unités 18S et 5.8S tandis que l'ITS2 est situé entre les sous-unités 5.8S et 28S. Dans les faits, il s'agit d'une portion d'ADN non-fonctionnel. Très variables d'une espèce à l'autre, les régions ITS1 et ITS2 sont néanmoins situées à proximité immédiate de régions fortement conservées, ce qui permet le design d'amorces pan-fongiques.

SOURCE : Horisawa et al., 2009

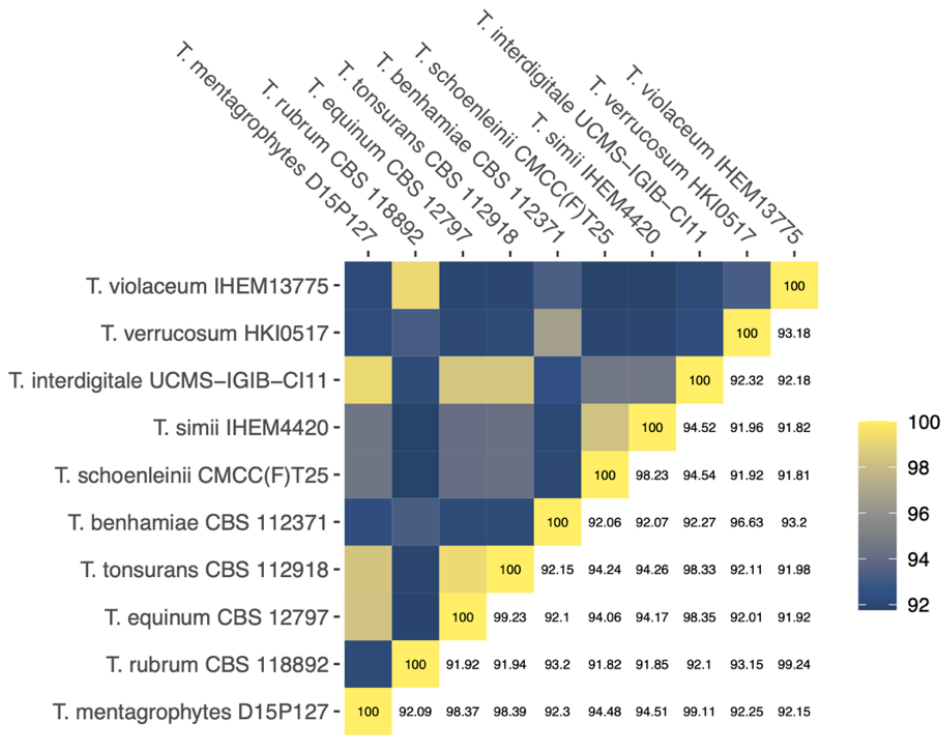


FIGURE 1.04. Représentation de la proximité génomique des dermatophytes du genre *Trichophyton*

La représentation est basée sur la comparaison de *l'ANI* entre génomes de référence. Le résultat est présenté sous forme de matrice de similarité. Plus les génomes sont proches, plus la valeur de l'ANI est élevée, et plus la couleur de la case formant l'intersection entre 2 génomes apparaît d'une couleur chaude. Les références des génomes utilisés sont les suivantes (*GenBank Accession Numbers)* : GCA_910591785.1 (*T. violaceum*), GCF_000151505.1 (*T. verrucosum*), GCA_019359935.1 (*T. interdigitale*), GCA_014839955.1 (*T. simii*), GCA_018357685.1 (*T. schoenleinii*), GCF_000151125.1 (*T. benhamiae*), GCA_000151455.1 (*T. tonsurans*), GCA_000151175.1 (*T. equinum*), GCF_000151425.1 (*T. rubrum*) et GCA_003664465.1 (*T. mentagrophytes*). Au moment de la création du graphique, les espèces suivantes ne possédaient pas de génome de référence déposé au sein de GenBank : *T. quinckeanum*, *T. concentricum*, *T. erinacei*, *T. eriotrephon* et *T. bullosum*. Dès lors, ces espèces ne sont pas prises en compte au sein de ce graphique. L'analyse a été réalisée grâce à fastANI *(**Jain et al., 2018**)* et la représentation graphique a été construite en utilisant le paquet ggplot2 *(**Wickham, 2016**)*.

1.1.1. Origine et évolution du parasitisme

Parmi les espèces de dermatophytes actuellement répertoriées, les plus anciennes appartiennent au groupe des dermatophytes telluriques. L'histoire de la Terre est divisée en 4 grandes ères géologiques : le précambrien, le paléozoïque, le mésozoïque et le cénozoïque. Cette dernière fût le théâtre, entre autres, de l'apparition des premiers petits mammifères à fourrure (il y'a de cela 125 millions d'années). C'est près de 50 millions d'années après cet événement majeur que de récentes études situent l'apparition du parasitisme chez les dermatophytes. Ces petits animaux vivant à ras du sol et, par conséquent, étant en contact rapproché et prolongé avec celui-ci contrairement à toutes les espèces qui ont précédé ont constitué un terrain parfait pour les dermatophytes et leur passage du sol à l'animal. Ce n'est que bien plus tard, lors de l'apparition d'*Homo habilis* en Afrique de l'Est et du Sud (il y'a approximativement 3 millions d'années) que les dermatophytes ont pu se transmettre à l'espèce humaine. D'abord cantonnés aux frontières de ce qu'était l'Afrique, la dispersion géographique des dermatophytes n'a été possible qu'avec l'apparition d'*Homo erectus*, premier homme à quitter le berceau africain il y'a de cela 2 millions d'années pour coloniser l'Asie dans un premier temps, puis l'Europe, un million d'années plus tard. L'apparition d'*Homo sapiens* il y'a 300.000 ans et toutes les conséquences que cet évènement a engendré (la domestication des animaux, entre autres) a permis d'accélérer encore plus la propagation des dermatophytes à travers le monde (*Chabasse, 2008*). A la lumière de ces éléments, il est aisé de comprendre pourquoi les dermatophytes sont aujourd'hui regroupés selon leur habitat naturel : les 3 groupes ont un parcours évolutionnel très différent et plusieurs millions d'années séparent les espèces zoophiles des espèces anthropophiles. Du fait de cette différence évolutionnelle, il est aujourd'hui admis que les espèces appartenant au groupe anthropophile n'ont pas divergé suffisamment en termes de marqueurs de diagnostic. Ceci pourrait, en partie, expliquer la difficulté qu'éprouvent les laboratoires à distinguer les espèces faisant partie de cette catégorie (*De Hoog et al., 2021*).

1.1.2. Modes de transmission

Les dermatophytes ne font pas partie de la flore présente naturellement. A ce titre, la contamination est systématiquement médiée par un support exogène. Ils peuvent être contractés de 3 manières différentes selon l'habitat naturel de l'espèce considérée. Pour ce qui est des espèces telluriques, elles ont tendance à se développer dans les sols riches en kératine animale. La contamination a lieu par contact direct entre ce sol dit « souillé » et une blessure ouverte. Il est très rare que ce type de dermatophyte soit transmis entre humains. Pour ce qui est des espèces zoophiles, la contamination a lieu par l'intermédiaire d'un animal porteur du dermatophyte. Ce dernier ne présente pas toujours les signes cliniques liés à une dermatophytose et peut, dans certains cas, être porteur sain. La présence d'un animal de compagnie au domicile du patient constitue donc une donnée clinique pertinente et peut, dans une certaine mesure, orienter le diagnostic d'une dermatophytose. Néanmoins, ceci est à considérer avec précaution puisque la contamination par l'intermédiaire de l'animal peut être directe (un contact physique entre le patient et l'animal porteur au moyen d'une caresse) ou indirecte (contact avec des poils contaminés appartenant à l'animal porteur). En pratique, il n'est donc pas possible d'exclure qu'un patient soit contaminé par une espèce zoophile et ce, même s'il ne possède pas d'animal de compagnie. En ce qui concerne la propagation interhumaine des espèces zoophiles, elle est possible mais demeure très rare. Le dernier mode de contamination concerne les espèces anthropophiles. À l'inverse des 2 premiers groupes, ces espèces dont l'habitat naturel est l'homme se transmettent fréquemment de façon interhumaine. La contamination peut être directe (contact avec un patient lui-même contaminé par le dermatophyte) ou indirecte. Pour ce dernier cas de figure, il existe une multitude de supports de propagation : une salle de bain contaminée par des squames parasitées, une fish-pédicure dans un centre négligeant sur l'hygiène des bassins ou encore un salon de coiffure utilisant une tondeuse contaminée après le passage d'un client atteint de teignes du cuir chevelu, les cas de figure sont nombreux et il est difficile d'en établir une liste exhaustive.

1.1.3. Phases du processus d'infection

La contamination à un dermatophyte peut être subdivisée en 3 étapes (*Kaufman et al., 2007*). La première d'entre-elles est l'adhésion du dermatophyte sur la surface du tissu parasité. Cette étape est médiée par des adhésines fongiques exprimées à la surface des micronidies. La seconde étape est la pénétration du dermatophyte au sein du tissu, suivie par la sécrétion d'enzymes qui permettent sa dégradation. Le but de cette dégradation est d'une part de permettre au dermatophyte de progresser au sein du tissu et d'autre part, de fournir une source de nutriments (*Zhang et al., 2013*). Enfin, la dernière étape consiste en l'invasion des couches profondes du tissu lésé par le dermatophyte. Ces 3 phases sont rythmées par la sécrétion de multiples enzymes (pour la plupart, des endoprotéases). Bien que ces enzymes soient actuellement mal connues, il est admis qu'elles sont à l'origine de la virulence des dermatophytes. Elles peuvent être classées en 2 grandes familles (*Monod et al., 2002*) : les subtilisines (qui sont des sérines protéases) et les fungalysines (qui sont des métalloprotéases). L'implication de la subtilisine Sub3 durant la phase d'adhérence a été démontrée chez les dermatophyte de l'espèce *M. canis* (*Baldo et al., 2010*). Pour ce qui est des dermatophytes du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*, une étude parue en 2014 a permis d'identifier le rôle majeur des métalloprotéases (et plus particulièrement des métalloprotéases Mep4 et Mep5) pour la virulence de ces espèces (*Zhang et al., 2013*). Pour ce qui est de la subtilisine Sub6, elle serait impliquée dans l'induction de la réponse immunitaire à la dermatophytose (*Shi et al., 2015*).

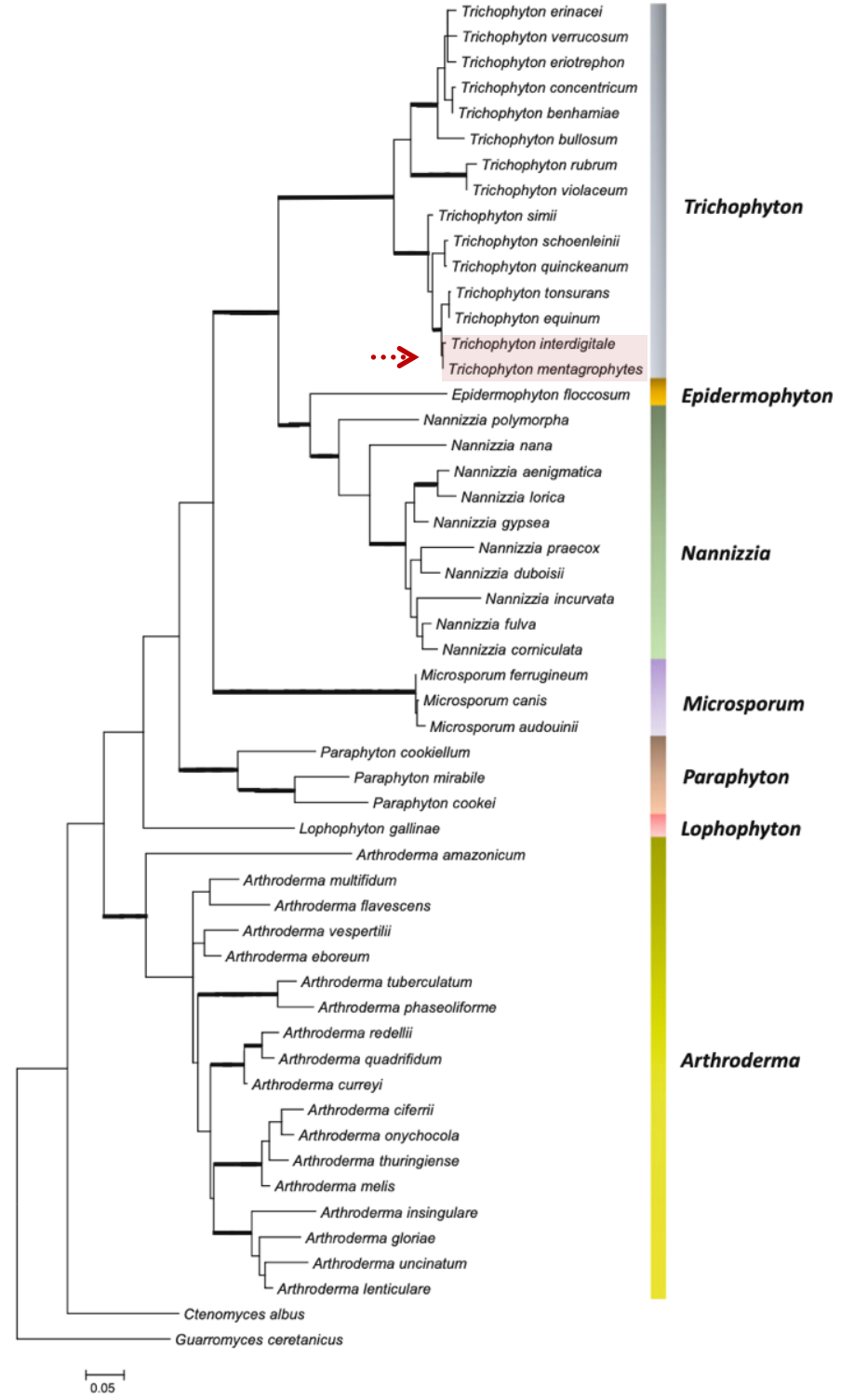


FIGURE 1.05. Classification actuelle des dermatophytes.

L'arbre est basé sur une analyse par maximum de vraisemblance de la région ITS des différents organismes qui composent la famille des Arthrodermataceae. La proximité entre *T. interdigitale* et *T. mentagrophytes* est surlignée en rouge. Il est à noter qu'au moment de la création de cette représentation, l'espèce *T. indotineae* n'existait pas. Dés lors, celle-ci n'apparaît pas sur le schéma. L'analyse a été réalisée grâce à RAxML v.8.2.12 (***Stamatakis, 2014***). Cette figure est basée sur la nouvelle classification des dermatophytes, telle qu'elle a récemment été redéfinie (***De Hoog et al., 2016***).

SOURCE : De Hoog et al., 2021

1.2. Taxinomie

Étant donné que les espèces ont évolué par le passé, elles sont plus ou moins apparentées entre elles. C'est donc l'ascendance commune qui justifie les groupes fabriqués par la systématique (*Lecointre & Camus, 2007*). Les classifications se sont longtemps basées sur les caractères morphologiques, d'abord macroscopiques, puis microscopiques. Néanmoins, au cours du siècle passé, une avancée majeure vint bouleverser ces dernières : la résolution du modèle de l'ADN par Rosalind Franklin (et dans une moindre mesure, Francis Crick et James Watson) ainsi que l'avènement de la biologie moléculaire qui s'ensuivit. Ceci a ouvert les portes à l'usage d'un élément bien plus spécifique des espèces pour classer celles-ci : les gènes. À partir de là, des classifications basées sur les gènes ont progressivement vu le jour. Les gènes sélectionnés ont la caractéristique d'être fortement conservés au sein d'une même espèce tout en ayant une certaine capacité de divergence phylogénétique. Pour déterminer cette cible au sein des champignons, c'est vers l'ADN ribosomal que les chercheurs se sont tournés puisqu'il s'agit de la région la plus conservée du génome. Au sein de cette région, l'ITS (pour Internal Transcribed Spacer) s'est avéré être un candidat de choix pour remplir la tâche de code-barre moléculaire (**FIGURE 1.03**). Introduite en 1990 pour son utilisation dans le cadre de la phylogénétique des champignons (*White et al., 1990*), il faudra attendre presqu'une décennie pour voir émerger les premières applications pour les dermatophytes. D'abord combinées aux séquences de la petite sous-unité ribosomale (*De Hoog et al., 1998*) puis prises en compte seules (*Makimura et al., 1999*), cette approche a permis la résolution de la problématique de classification d'une pléthore d'espèces de dermatophytes dans ce qui sera la première taxinomie moléculaire du genre *Trichophyton* (*Gräser et al., 1999*). Néanmoins, ce n'est qu'en 2012 que l'utilisation de l'ITS en tant que code-barre moléculaire universel pour l'identification et la classification des champignons fut suggérée (*Schoch et al., 2012*). Aujourd'hui, cette région est largement utilisée pour étudier les relations intra et inter espèces au sein du règne des mycètes. Dans les laboratoires de biologie clinique, l'amplification de cette région suivie de son séquençage permet l'identification des espèces isolées en pratique aux moyens d'un alignement de séquences sur l'une ou l'autre DB. Cependant, cette manière de procéder possède ses limites. Certaines de ces limites sont inhérentes à la proximité génomique de certaines espèces de mycètes, à l'image du *T. mentagrophytes* et du *T. interdigitale*, qui ont plus de 99% de leur génome en commun (**FIGURE 1.04**). D'autres sont liées aux DB utilisées pour l'identification, à l'image de GenBank, la DB du NCBI, qui contient une quantité significative de séquences dont l'espèce a été mal définie au départ (*Irinyi et al., 2015*). De manière générale, il est aujourd'hui admis qu'environ 25% des spécimens fongiques d'intérêt médical ne sont pas identifiables sur base de l'ITS seul. Ceci créa la nécessité de développer un code-barre secondaire, avec la perspective d'une augmentation de résolution et de pertinence quant au *barcoding* des mycètes dans le diagnostic des maladies fongiques. En 2015, le *translational elongation factor 1 alpha* (TEF1α) a été sélectionné pour remplir ce rôle. Néanmoins, la mention de ce gène en tant que code-barre étant relativement récente, son utilisation en pratique est très limitée du fait de l'absence de DB fiable et suffisamment fournie pour y permettre l'alignement des séquences. Ainsi, c'est seulement en 2018 que la création d'une telle DB fut entreprise par l'ISHAM (*Meyer et al., 2018*).

1.2.1. Taxinomie des dermatophytes

Bien que les premières descriptions de dermatophytes remontent au milieu du XIX^{ème} siècle (*Schönlein, 1839*), il faudra attendre le début du XX^{ème} siècle pour voir apparaître la première étude systématique des dermatophytes. Dans son ouvrage intitulé « Les teignes », le docteur Raymond Jacques Adrien Sabouraud se base d'une part sur les caractéristiques morphologiques des dermatophytes et d'autre part sur les aspects cliniques des lésions qu'ils engendrent pour proposer une première classification en 4 genres : *Achorion*, *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton* (*Sabouraud, 1910*). Deux décennies plus tard, Chester Wilson Emmons se base sur la morphologie des spores produites en culture et propose de supprimer le genre *Achorion*, ne définissant plus que 3 genres : *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton* (*Emmons, 1934*). Jusqu'à la fin du XX^{ème} siècle, les dermatophytes sont identifiés et classés uniquement d'après leurs caractères phénotypiques. Cette situation créa un terrain propice à la confusion. D'une part, il existait des espèces pour lesquelles aucune souche de référence n'avait été déposée dans une quelconque collection et, d'autre part, deux espèces génotypiquement proches peuvent présenter des aspects morphologiques fort différents en culture et qu'à l'inverse, des isolats d'espèces génotypiquement éloignées peuvent présenter un même aspect morphologique en culture, le monde assista à une profusion de dénominations différentes qui, parfois, désignaient une seule et même espèce. En 2016, une révision majeure des espèces de dermatophytes et de leur nomenclature a vu le jour (*De Hoog et al., 2016*). Cette révision se base sur l'étude génomique des régions suivantes : ITS, ß-tubuline, LSU partielle et la protéine ribosomale 60S. Grâce aux apports de cette classification, chaque espèce possède désormais une seule dénomination (**FIGURE 1.05**). Néanmoins, certaines difficultés d'identification persistent à ce jour, notamment (mais pas seulement) au sein du groupe *T. mentagrophytes / interdigitale / indotineae*. En effet, ces souches sont très proches les unes des autres, à la fois d'un point de vue phénotypique que génotypique, si bien qu'avant la nouvelle classification des dermatophytes, *T. interdigitale* fut longtemps considéré comme étant une variété de *T. mentagrophytes* et non comme étant une espèce à part entière.



FIGURE 1.06. Formes cliniques de l'onychomycose

A. Onychomycose sous-unguéale latérale. ***B.*** Onychomycose sous-unguéale distale. ***C.*** Onychomycodystrophie totale. ***D.*** Onychomycose sous-unguéale proximale.

SOURCE : Araiza-Santibanez et al., 2015



FIGURE 1.07. Aspects cliniques des lésions causées par *T. indotineae*

A. Plaques squameuses avec érythème et papules au niveau des bras. ***B.*** Erythème annulaire centrifuge du tronc après administration de corticostéroïdes topiques et systémiques. ***C.*** Plaques érythémateuses et squameuses. ***D.*** Lésions cutanées prurigineuses de l'aine et des creux axillaires.

SOURCE : Dellière et al., 2022



FIGURE 1.08. Aspect des lésions d'un *tinea corporis*

Les lésions ont été photographiées chez un patient immunocompétent âgé de 14 ans, après un retour de vacances d'Algérie. Il s'agit donc d'un cas d'importation détecté à Paris en 2020.

SOURCE : Akhoundi et al., 2020

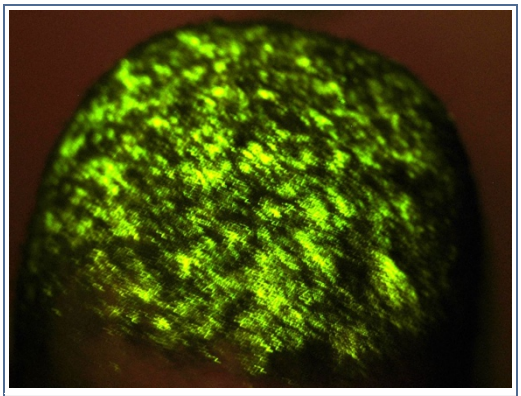


FIGURE 1.09. Examen à la lampe de Wood positif

La fluorescence émise indique la présence d'une infection fongique.

SOURCE : Mekkes, 2022



FIGURE 1.10. Lésions d'un *tinea capitis*

La zone d'allopécie indique la présence d'un dermatophyte à ce niveau.

SOURCE : Mekkes, 2022

1.3. Manifestations cliniques

Les infections à dermatophytes, également appelées dermatophytoses ou encore teignes, ont une dénomination et une symptomatologie qui varie selon la localisation de la zone touchée. Chez l'Homme, elles se manifestent généralement par des lésions superficielles de la peau et des phanères. Il existe différentes appellations pour les dermatophytoses. Cependant, le système d'appellation le plus répandu est anglo-saxon et résulte de la concaténation du mot latin « *Tinea* » (ou teigne en français) et du nom latin donné à la zone corporelle touchée. A des fins de simplification, il est possible de regrouper les dermatophytoses en 3 catégories : les dermatophytoses du cuir chevelu, les dermatophytoses de la peau glabre et des ongles, et pour finir, les dermatophytoses atypiques. Dans tous les cas, lorsque ces dermatophytoses sont mal diagnostiquées (et par conséquent, mal traitées), des complications surgissent et peuvent, dans certains cas, mener au décès du patient (surtout dans le cas des dermatophytoses atypiques).

1.3.1. Dermatophytoses de la peau glabre et des ongles

L'agent à l'origine de ces dermatophytoses est, dans la majorité des cas, le *T. rubrum*, suivi par les espèces appartenant au complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. Les atteintes des ongles représentent les formes cliniques les plus fréquentes d'une dermatophytose. Également appelées onychomycoses (ou encore *Tinea unguium*), leur prévalence augmente avec l'âge. Elles sont classées en 4 sous-catégories selon le bord d'attaque et le sens de progression du dermatophyte au sein de l'ongle (***FIGURE 1.06***) : l'onychomycose sous-unguéale distolatérale, l'onychomycose sous-unguéale proximale, les leuconychomycoses superficielles et, finalement, l'évolution des 3 formes précédentes, l'onychomycodystrophie totale, qui correspond à une destruction totale de l'ongle. Les atteintes cutanées, également appelées épidermophyties (ou encore *Tinea corporis*) sont quant à elles subdivisées en 2 catégories. La première est celle des épidermophyties circinées (autrefois appelées herpès circiné), localisées sur les zones glabres de la peau. Elles se caractérisent par l'apparition d'une zone érythémateuse qui évolue de manière centrifuge. Connue du public sous l'appellation « roue de Sainte-Catherine », cette manifestation clinique apparaît le plus souvent sur les zones découvertes de la peau, là où la probabilité d'un contact avec un animal de compagnie contaminé est plus élevée. La seconde catégorie est celle des épidermophyties des plis, également connues sous le nom d'intertrigos. Ces régions font l'objet de frottements, ce qui a tendance à augmenter indirectement l'humidité locale. Cette humidité favorise la macération des tissus et constitue elle-même un facteur qui favorise le développement des dermatophytes. A nouveau, les pieds (et plus particulièrement les espaces inter-orteils) représentent la structure anatomique la plus touchée par cette forme de dermatophytose, mais ces dernières peuvent également toucher les grands plis (plis axillaires, sous-mammaires ou encore inter-fessier). Les dermatophytoses de la peau, bien que majoritairement limitées lors de leur propagation, peuvent donner lieu à des atteintes étendues (surtout si le patient est pris en charge tardivement ou que le dermatophyte impliqué est résistant à la terbinafine). Connues sous le nom de *Tinea corporis* étendu, ces affections touchent plus de 10% de la surface corporelle totale et sont de plus en plus décrites dans la littérature, surtout dans le nord de l'Inde, où une épidémie de cas est en cours (***FIGURES 1.07 & 1.08***). Les lésions causées sont souvent annulaires et les patients atteints se plaignent souvent d'un prurit réfractaire. Les zones impactées sont l'aine, les creux axillaires, le tronc, les membres et le visage. De manière intéressante, les extrémités et les ongles semblent épargnés par ce type de dermatophytose (*Dellière et al., 2022*).

1.3.2. Dermatophytoses du cuir chevelu

Les dermatophytoses du cuir chevelu (***FIGURES 1.09 & 1.10***) sont rares chez l'adultes et sont, à l'inverse, très fréquentes chez l'enfant (en particulier ceux qui sont en contact avec les populations immigrées). Elles sont causées par 2 genres de dermatophytes : ceux qui appartiennent au genre *Microsporum* et ceux qui appartiennent au genre *Trichophyton*. Très contagieuses, elles impliquaient autrefois une mise à l'écart systématique de l'enfant atteint et ce, malgré les conséquences psychosociales engendrées. La politique en la matière a depuis été adaptée, l'éviction scolaire n'étant plus une obligation à condition que le patient fasse preuve de compliance envers son traitement. Les dermatophytoses du cuir chevelu sont elles-mêmes subdivisées en 4 sous-catégories selon la symptomatologie clinique et le type de parasitisme pilaire (***FIGURE 1.11***). La première sous-catégorie est celle des teignes tondantes microsporiques, qui se manifestent par de grandes plaques d'alopécie généralement peu nombreuses. Positives à la lampe de Wood (***FIGURE 1.09***), ces teignes sont causées par des dermatophytes du genre *Microsporum* qui parasitent le cheveu selon le type endo-ectothrix microsporique. La seconde sous-catégorie est celle des teignes tondantes trichophytiques, qui se manifestent par de nombreuses petites plaques d'alopécie croûteuses et desquamantes. Ces dernières sont dues à des espèces anthropophiles du genre *Trichophyton*, qui ont la caractéristique d'être négatives à la lampe de Wood et de parasiter le cheveu selon le type endothrix. La troisième sous-catégorie est celle des teignes inflammatoires, aussi appelées kérions ou teignes suppurées. Ces dernières se manifestent par des plaques d'alopécie érythémato-squameuses très inflammatoires qui finissent par se surélever pour former une coupole. Ces coupoles se recouvrent de pustules qui laissent couler un pus abondant.

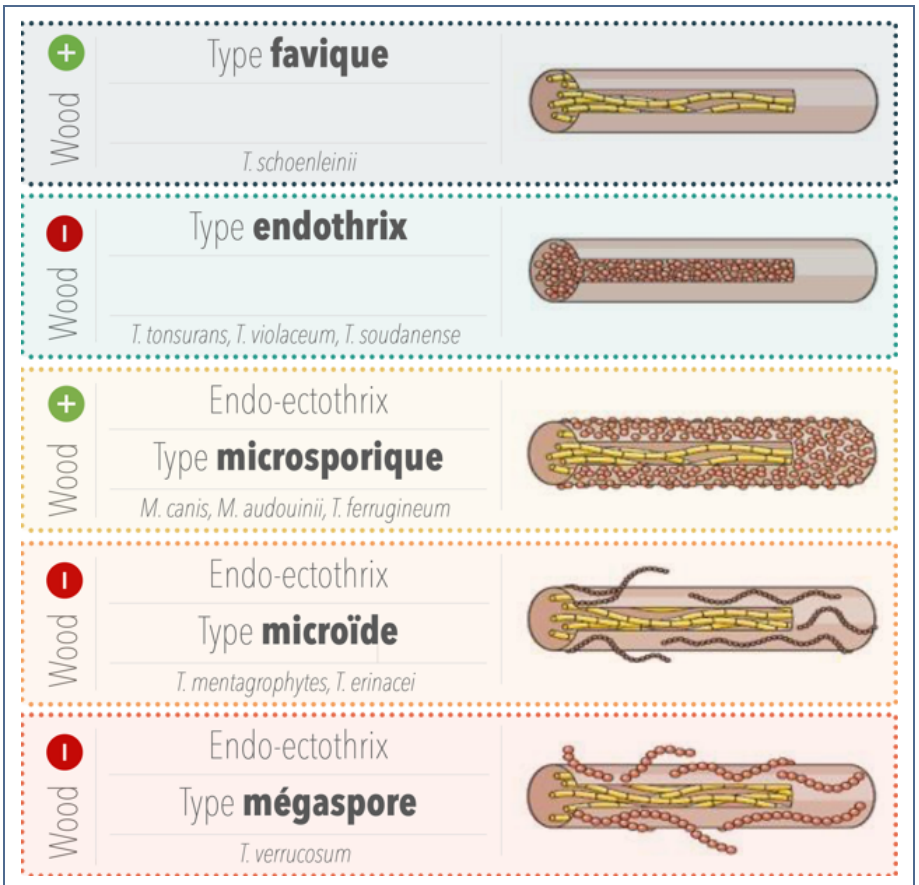


FIGURE 1.11. Types de parasitisme pilaire

Lorsqu'un *Tinea capitis* est suspecté, un cheveu est prélevé afin d'être analysé au microscope. Cette analyse permet d'orienter l'identification de l'espèce responsable. Au sein du cheveu parasité selon le type favique, de rares filaments sont observés. Le cheveu parasité selon le type endo-ectrothrix microsporique est recouvert d'une gaine de spores de 2 µm. Le cheveu parasité selon le type endothrix trichophytique montre un amas de spores de 4 µm à l'intérieur de ce dernier. Le cheveu parasité selon le type endo-ectrothrix microïde montre des chaînettes de petites spores de 2 µm à la surface de ce dernier. Enfin, le cheveu parasité selon le type endo-ectrothrix mégaspore montre des chaînettes de grosses spores à la surface de ce dernier.

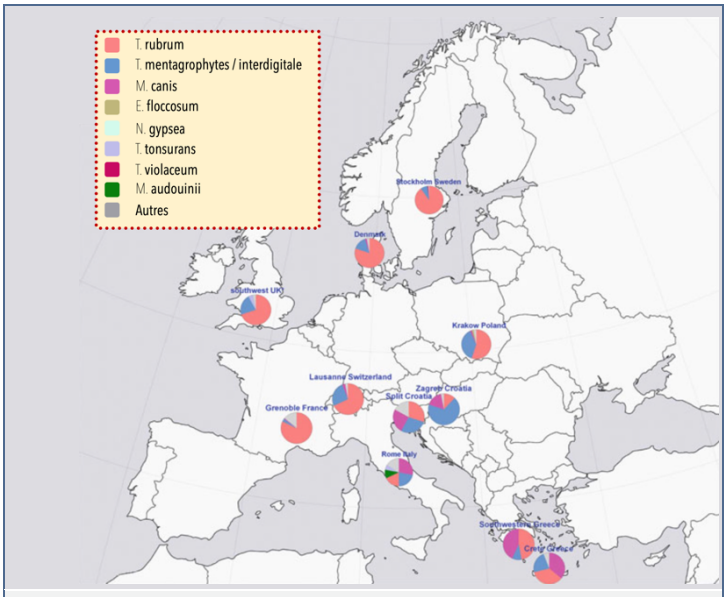


FIGURE 1.12. Distribution des dermatophytes en Europe

La carte est basée sur les souches isolées à partir des infections d'ongles et de peau. Les proportions prennent en compte les études publiées après 2000.

SOURCE : Zhan et al., 2021

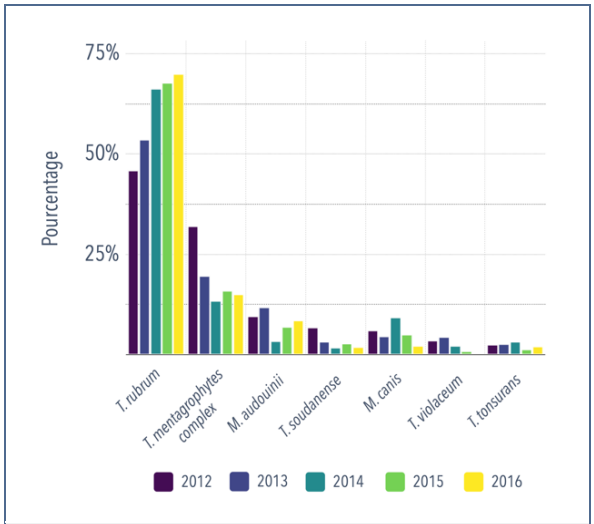


FIGURE 1.13. Distribution des dermatophytes en Belgique

Le graphique est adapté de l'étude réalisée par le CNRML et tient compte des chiffres établis entre 2012 et 2016. L'espèce prédominante est *T. rubrum*, dont la fréquence croît au fil du temps et ce, de manière statistiquement significative ($p < 0.0001$). Le complexe *T. mentagrophytes* regroupe 3 espèces non-discriminées lors de l'étude : *T. mentagrophytes*, *T. benhamiae* et *T. interdigitale*.

SOURCE : Sacheli et al., 2021

Contrairement aux 2 dernières sous-catégories, ce type de lésion est très douloureuse pour le patient. Elles sont dues à des espèces zoophiles dont l'espèce majoritaire est *T. mentagrophytes* et ont la caractéristique d'être négatives à la lampe de Wood, ainsi que de parasiter le cheveu selon le type endo-ectrothrix microïde. Enfin, la dernière sous-catégorie est celle des teignes faviques, qui sont positives à la lampe de Wood et qui parasitent le cheveu selon le type favique. Dans ce type de parasitisme, l'agent responsable (*T. schoenleinii*, une espèce anthropophile très rare) envahit le cheveu dans un premier temps, puis régresse en laissant derrière lui des galeries vides. Ce sont ces galeries qui sont visibles au microscope.

1.3.3. Dermatophytoses atypiques

Bien qu'il existe des manifestations plus rares liées à la présence d'un dermatophyte, la majorité de ces complications n'apparaissent que chez des patients immunodéprimés. Elles sont classées en 4 catégories. La première est le granulome de Majocchi, qui est dû à une colonisation trichophytique profonde des follicules pileux à la suite d'un traumatisme (le plus souvent, un rasage mal exécuté) qui permet le transfert du dermatophyte dans le derme (*Barbé et al., 2018*). La seconde catégorie est celle des dermatophytoses profondes qui, à l'inverse des premières, ne se limitent pas à la zone périfolliculaire. Ces dernières peuvent coloniser les tissus profonds qui forment la peau, tout en restant limités à celle-ci. Lorsque le dermatophyte est capable de s'étendre au-delà de la peau, l'infection est qualifiée de dermatophytose disséminée, troisième catégorie de manifestations rares. Le dermatophyte est alors capable de se propager soit par proximité anatomique des structures colonisées, soit directement par voie systémique. Certaines études ont relaté le cas de patients victimes d'atteintes du système nerveux central médiées par des dermatophytes (*Boudghene Stambouli et al., 2017*). Il est à noter que ce type de manifestations invasives sont très rare et ne concernent que des patients gravement immunodéprimés. Enfin, la dernière catégorie est celle des mycétomes. A l'instar des 2 dernières, cette dermatophytose atypique est une maladie infectieuse chronique qui s'étend progressivement aux tissus sous-cutanés et aux os. Elle touche souvent les pieds et se manifeste sous forme de tuméfaction fistulisée.

1.4. Distribution des dermatophytes en Europe

Les dermatophytoses de la peau et des ongles représentent les mycoses les plus fréquentes. Au cours de la première décennie du XXI^{ème} siècle, le monde assista à un rebond de prévalence des dermatophytoses (*Havlickova et al., 2008*). Ce rebond s'est accentué au cours de la seconde décennie, si bien qu'actuellement, il est estimé qu'un quart de la population mondiale est impacté par ces mycoses (*Hayette et al., 2019*). Leur distribution à travers le monde n'est pas homogène : certains dermatophytes sont cosmopolites, c'est le cas de *T. rubrum*, *T. interdigitale*, *E. floccosum* ou encore T. *tonsurans*. D'autres sont restreints à certaines parties du globe, c'est le cas de *T. soudanense* (Afrique), *T. violaceum* (Afrique, Europe et Asie), *T. schoenleinii* (Afrique et Asie) ou encore *T. concentricum* (îles pacifique et Asie du sud). Les facteurs qui influencent cette distribution sont à la fois d'ordre géographiques et socioéconomiques. Ainsi, les conditions sanitaires, la densité de la population, l'accès à l'eau potable, l'usage d'antifongiques ou encore la migration des populations de l'hémisphère sud vers l'hémisphère nord conditionnent tant la prévalence que la nature des dermatophytoses observées localement. Le vieux continent connaît un regain de dermatophytoses depuis la seconde guerre mondiale, qui s'est accentué au cours des deux dernières décennies. Cette augmentation de prévalence est surtout marquée en termes d'infections anthropophiles importées de l'étranger. Elle est d'autant plus visible au sein des grandes villes, sujettes d'une part à une immigration plus soutenue venue d'Afrique de l'Ouest / îles Caraïbes que les zones rurales (*Ameen, 2010*) et qui, d'autre part, représentent des spots touristiques (c'est le cas de Paris, entre autres) pour une population venue du monde entier (*Gits-Muselli et al., 2016*). Les principales manifestations cliniques sont des lésions des pieds et des ongles, dont l'agent étiologique majoritaire est le *T. rubrum*, suivi par *T. mentagrophytes / interdigitale* (***FIGURE 1.12***). Entre 2012 et 2016, le CNRML a analysé les données nationales concernant la répartition des dermatophytes. Le but de cette étude était d'établir la distribution des dermatophytes en Belgique et de la comparer à la distribution dans les autres pays Européens (*Sacheli et al., 2021*). Les résultats obtenus ont confirmé l'hypothèse selon laquelle le dermatophyte majoritaire au sein des pays développés est le *T. rubrum,* dont l'incidence croît de manière statistiquement significative entre 2012 et 2016 en Belgique (***FIGURE 1.13***). Ceci peut s'expliquer, entre autres, par l'utilisation de chaussures occlusives et d'installations sanitaires communes (bains de pieds, piscines et douches), créant ainsi un terrain propice à la propagation de ce dermatophyte. Une augmentation de l'incidence d'espèces anthropophiles (*M. audouinii, T. soudanense* et *T. violaceum*), principalement d'origine africaine, a également été mise en évidence et est très certainement en lien avec différentes vagues d'immigration en provenance de régions d'Afrique où ces souches sont endémiques. Cette même observation a été réalisée en Italie (et plus précisément à Milan), où *T. violaceum* et *T. soudanense* sont devenus les principaux agents impliqués dans les lésions capillaires dues au dermatophytes (*Mapelli et al., 2013*) tandis que ces mêmes espèces n'y étaient que très rarement détectées avant l'an 2000.

1.5. Méthodes de diagnostic

Historiquement, l'identification des agents pathogènes est basée sur l'analyse de leur morphologie (microscopique et/ou macroscopique). Par la suite, il y eut l'essor des tests biochimiques en tubes à essai qui furent pendant longtemps le *gold standard* de l'identification.

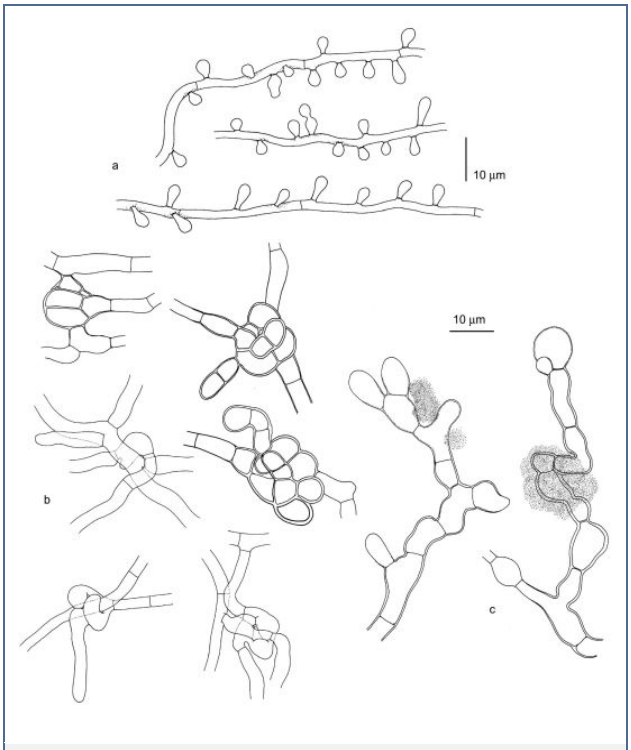


FIGURE 1.14. Morphologie schématique du *T. interdigitale*

A. Micronidies. **B.** Nodules du mycélium aérien. **C.** Hyphe productrice de pigments.

SOURCE : De Hoog et al., 2020

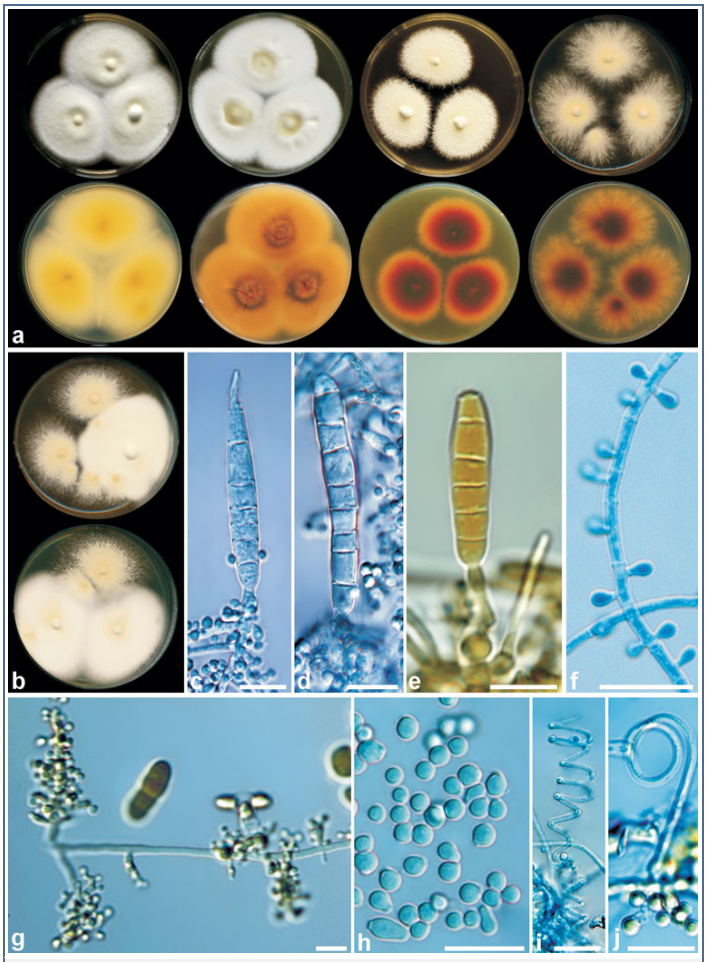


FIGURE 1.15. Morphologie des *T. interdigitale* CCF 4825, 4822, 4823 et ME1269

La barre d'échelle présente en bas à droite de chaque schéma représente 10 µm. **A.** Aspect macroscopique (recto et verso) de plusieurs génotypes de T. interdigitale en culture sur milieu Sabouraud Gentamicine Agar après 2 semaines d'incubation à 25°C. **B.** Souches de T. interdigitale montrant 2 phénotypes différents en culture. **C-E.** Macronidies en forme de cigares. **F-G.** Conidiophores avec micronidies. **H.** Micronidies. **I-J.** Hyphes courbés en spirale.

SOURCE : De Hoog et al., 2020

Néanmoins, les outils de diagnostic appliqués à l'identification des espèces ont fortement évolué au cours des trois dernières décennies. Actuellement, les méthodes moléculaires ont largement surpassé les méthodes d'identification basées sur les caractères phénotypiques (*Hayette & Sacheli, 2017*). Pour le cas particulier des dermatophytes, l'identification nécessite de prendre en compte à la fois les données cliniques du patient et l'aspect morphologique des souches isolées afin d'atteindre le seuil de certitude nécessaire. En 1996, une étude a souligné l'importance de l'identification correcte de l'espèce du dermatophyte impliqué dans l'infection. Sans qu'ils ne sachent l'expliquer à ce stade, les auteurs ont su démontrer que ces souches présentaient une sensibilité *in vitro* à la terbinafine qui était comparable entre les espèces mais que la réponse au traitement basé sur cette molécule varie fortement en fonction de l'espèce isolée. Le taux de guérison semble excellent pour *T. violaceum* et *T. soudanense* tandis qu'il fluctue pour *T. mentagrophytes* (*Baudraz-Rosselet et al., 1996*). En cas d'utilisation inappropriée de l'un ou l'autre antifongique, des phénomènes de résistance peuvent émerger, induisant par la même occasion des complications liées à la prise de traitements plus lourds et/ou plus longs. Concernant l'identification, des variations morphologiques peuvent être induites au sein du dermatophyte à la suite de la prise d'un antifongique inapproprié. Ces variations compliquent d'autant plus l'identification et retardent la prise du traitement adéquat.

1.5.1. Prélèvement et anamnèse du patient

Tout diagnostic d'une infection fongique débute par un prélèvement. La qualité de celui-ci conditionne la qualité des résultats qui en découleront. Il s'agit donc d'une étape cruciale qui est, à ce titre, réalisée par un dermatologue ou un mycologue. Une condition *sine qua non* encadre ce prélèvement : il doit être effectué chez un patient en dehors de tout traitement antifongique, qu'il soit local ou systémique. Dans le cas où le traitement a débuté, une suspension de celui-ci pendant 15 à 90 jours est nécessaire avant de procéder à un nouveau prélèvement. L'anamnèse du patient permet d'apporter certains éléments pertinents au tableau clinique (présence d'animaux de compagnie au domicile du patient, séjour à l'étranger ou encore pratique d'une activité sportive impliquant l'utilisation fréquente d'installations sanitaires communes). Le statut immunitaire du patient figure également parmi les éléments importants du tableau clinique puisque ce dernier est directement corrélé à la sévérité de la dermatophytose. Il est donc cliniquement pertinent de relever si le patient présente un antécédent de transplantation, s'il a suivi une thérapie immunosuppressive ou encore s'il est séropositif au HIV. L'origine du prélèvement est aussi une donnée importante et permet d'orienter l'identification, puisqu'il existe une certaine spécificité de localisation selon l'espèce de dermatophyte considérée. A titre d'exemple, une lésion localisée sur une zone découverte de la peau orientera l'identification vers une souche zoophile voire tellurique tandis qu'une lésion localisée au niveau d'une zone couverte de la peau indique la présence d'un dermatophyte de type anthropophile. Pour finir, il existe un examen rapide et non-invasif qui permet d'établir dans certains cas la nature mycologique d'une lésion : l'examen direct *in situ* à la lampe de Wood. Il s'agit en réalité d'une lampe qui émet des rayons ultraviolets. Au contact de ces rayons, les agents microsporiques (dont le chef de file est *M. audouinii*) apparaissent teintés d'une fluorescence verte. L'absence de fluorescence ne permet cependant pas de conclure sur l'absence d'infection fongique puisque les agents trichophytiques (à l'exception de *T. schoenleinii*) ne réagissent pas à ces rayons (**FIGURE 1.11**).

1.5.2. Examen direct du prélèvement

L'échantillon prélevé sur le patient est examiné au microscope afin de mettre en évidence la présence d'un champignon. Pour faciliter cet examen, il est courant d'avoir recourt à un produit éclaircissant dont le rôle est de digérer la kératine, facilitant ainsi la visualisation des filaments fongiques. Deux substances sont couramment utilisées pour remplir ce rôle : l'hydroxyde de potassium et le lactophénol d'Amann. Le premier est directement actif, ce qui force l'observation sous un laps de temps court. Le second permet quant à lui une conservation longue-durée des lames. Pour augmenter la sensibilité de l'examen, certaines substances contrastantes sont utilisées. Ces dernières peuvent être fluorescentes (à l'instar du blanc de calcofluor, colorant non-spécifique qui met en évidence les polysaccharides des parois fongiques) ou non (chloral-lactophénol). Cependant, l'examen direct le plus sensible est un examen histopathologique du prélèvement. Il est basé sur l'utilisation d'un colorant spécifique des polysaccharides contenus dans la paroi des champignons et permet la mise en évidence des filaments au microscope. En pratique, différents colorants peuvent être utilisés : c'est le cas de l'hématoxyline-éosine ou encore de la méthénamine d'argent (selon la méthode de Grocott). Néanmoins, le but de cet examen n'est pas d'identifier directement l'espèce impliquée mais d'apporter des éléments supplémentaires pour l'identification (*Gupta et al., 2017*). Au CHU de Liège, seul l'examen histopathologique est réalisé. Le colorant utilisé est l'acide périodique de Schiff (PAS).

1.5.3. Examen macroscopique de la culture

L'échantillon prélevé sur le patient est mis en culture pour permettre la croissance du dermatophyte responsable de l'infection. A cette fin, le milieu de culture par excellence est le milieu Sabouraud. La sélectivité des champignons vis-à-vis des espèces bactériennes est obtenue par le pH légèrement acide (pH = 5.6) du milieu, mais aussi par l'ajout de certains antibiotiques (gentamicine et chloramphénicol). Il est possible de rendre ce milieu encore plus sélectif des dermatophytes grâce à l'ajout d'un antifongique, le cycloheximide. Les dermatophytes, à l'inverse des levures et autres moisissures, sont résistants à cette molécule. Le milieu est ensuite incubé à 30°C en aérobie.

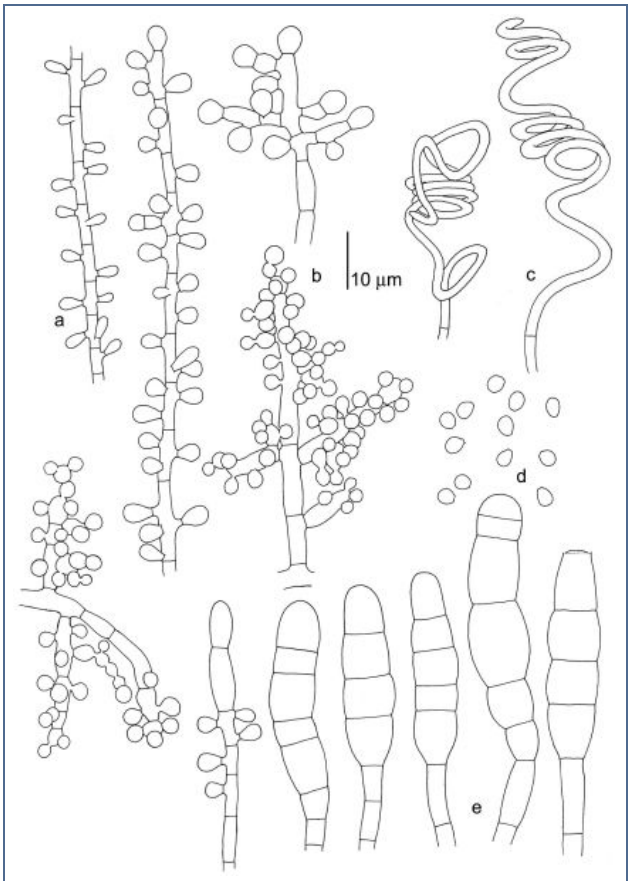


FIGURE 1.16. Morphologie schématique du *T. mentagrophytes*

A. Micronidies immatures en branches. ***B.*** Micronidies matures en branches. ***C.*** Hyphe courbé en spirale. ***D.*** Micronidies libres. ***E.*** Macronidies.

SOURCE : De Hoog et al., 2020

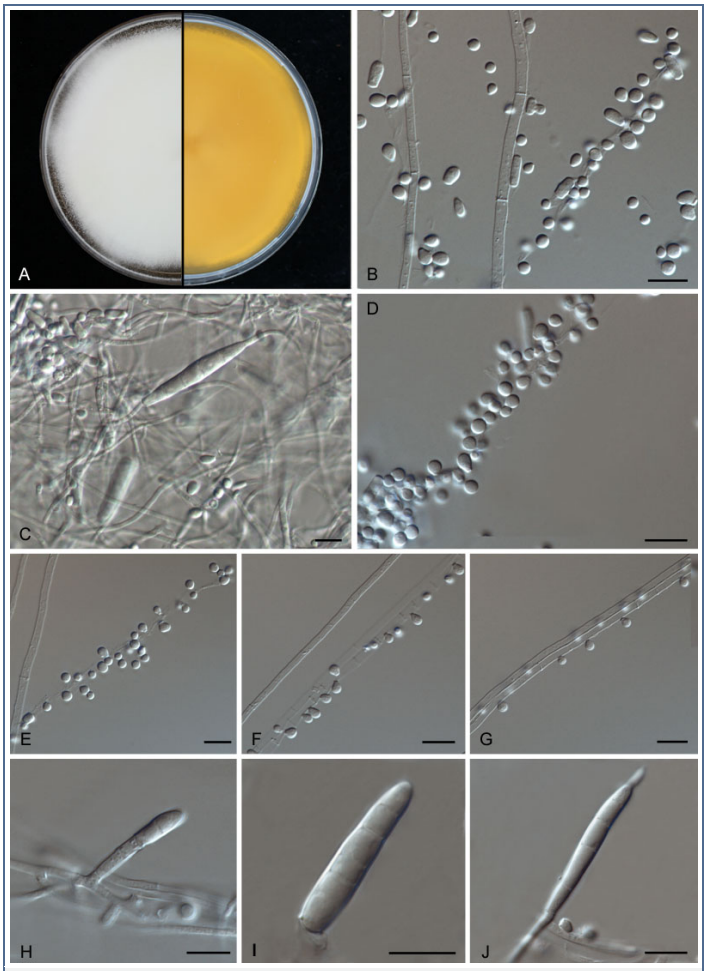


FIGURE 1.17. Morphologie du *T. mentagrophytes* CBS 120357

La barre d'échelle présente en bas à droite de chaque schéma représente 10 µm. ***A.*** Aspect macroscopique (recto et verso) de la culture sur milieu Sabouraud Gentamicine Agar après 3 semaines d'incubation à 27°C. ***B & D-G.*** Micronidies. ***C.*** Micronidies et macronidies. ***H-J.*** Macronidies.

SOURCE : De Hoog et al., 2020

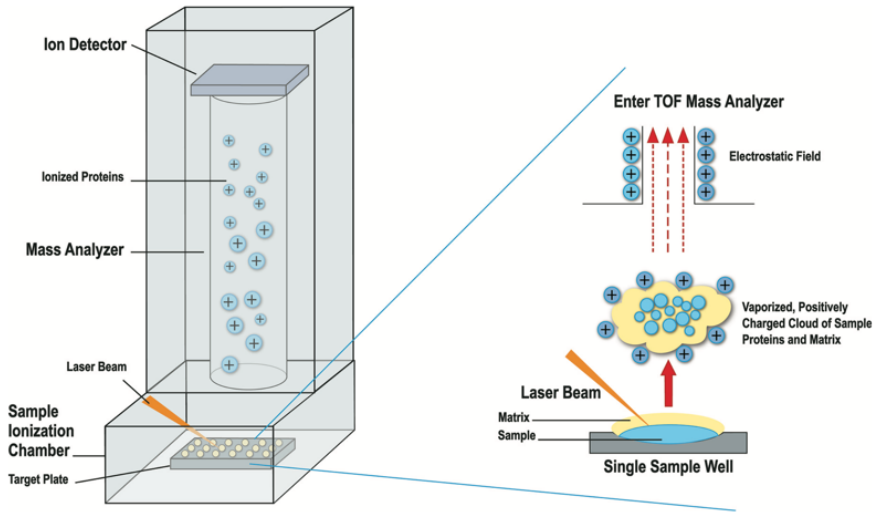


FIGURE 1.18. Principe de la spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'échantillon recouvert de la matrice est bombardé à l'aide d'un laser, ce qui le vaporise. Le nuage ionique créé est ensuite soumis à une différence de potentiel, ce qui accélère les particules chargées. Parmi celles-ci, les plus légères traversent ce champ plus rapidement et heurtent un détecteur d'ions situé à la sortie de l'unité d'analyse du temps de vol. Ces données sont analysées par un logiciel, qui génère un spectre.

SOURCE : Patel, 2015

La cinétique de croissance n'est pas à négliger, cette dernière étant caractéristique des espèces, elle constitue un paramètre intéressant pour orienter l'identification. A titre d'exemple, un *T. mentagrophytes* aura une croissance un peu plus lente qu'un *T. interdigitale*. Le technologue étudiera une série de paramètres macroscopiques, dont la structure, le pourtour des colonies, le relief, la consistance, la couleur ou encore la présence d'une pigmentation qui diffuse dans l'agar (recto et verso). Tous ces paramètres sont utiles au diagnostic différentiel des espèces.

1.5.4. Examen microscopique de la culture

L'examen macroscopique est suivi d'un examen microscopique de la culture. Pour effectuer un transfert correct du milieu de culture vers la lame, il est d'usage de procéder par la méthode du drapeau de Roth. Celle-ci consiste à déposer délicatement un fragment de ruban adhésif à la surface de la culture, puis à retirer ce fragment à l'aide d'une pince hémostatique ou d'un fin filament qui y aura été préalablement attaché. Ce fragment est ensuite déposé sur une lame porte-objet, sur laquelle une goutte de chloral-lactophénol aura été disposée au préalable. Le fragment est recouvert d'une lamelle couvre-objet et le montage est observé au microscope. Les paramètres utiles au diagnostic différentiel entre espèces sont l'aspect des filaments du mycélium, la présence de chlamydospores et/ou de filaments toruloïdes, la présence et la forme des micro- et des macronidies ainsi que la présence et la forme d'autres structures appelées « ornementations » dans la littérature. Concernant les espèces du complexe *T. mentagrophytes / interdigitale*, la combinaison de ces paramètres peut permettre un diagnostic différentiel à ce stade. En effet, certaines variations phénotypiques existent entre ces 2 espèces (***FIGURES 1.14 - 1.17***). Ces variations étant assez subtiles, la distinction des espèces sur base de leur morphologie reste une science où les exceptions sont légion et, par conséquent, réservée aux mycologues avisés. Néanmoins, le diagnostic différentiel peut s'établir à la fois avec les espèces qui forment le complexe étudié (*T. interdigitale* est exclusivement anthropophile) mais également avec des espèces proches, à l'instar de *T. schoenleinii* (parasitisme capillaire exclusivement favique, absence de conidies et présence de chlamydospores) ou encore de *T. benhamiae* (associé aux cochons d'Inde). Malheureusement, cet examen microscopique n'est possible que si le dermatophyte a donné lieu à une sporulation. En cas de souche stérile ou atypique, il convient de mettre en culture celle-ci sur des milieux appauvris qui favorisent la sporulation (c'est le cas notamment du milieu de culture Takashio, qui est un milieu de Sabouraud dilué). Si les informations recueillies sont discordantes avec le tableau clinique du patient et/ou en cas de difficultés à l'identification, deux approches co-existent pour établir un diagnostic : d'une part, l'étude du profil protéique grâce à la spectrométrie de masse et d'autre part, l'étude des gènes grâce à la biologie moléculaire.

1.5.5. Examen du profil moléculaire par spectrométrie de masse

Cette approche, rapide et peu couteuse, n'est pas nouvelle en soi : elle est utilisée dans les laboratoires de chimie depuis près de 2 décennies et permet l'identification/quantification de diverses molécules d'intérêt. Pour ce qui est de l'identification des bactéries/levures au laboratoire de microbiologie du CHU de Liège, la méthode utilisée depuis mai 2009 est basée sur la *soft-ionization* : il s'agit de la *Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-Of-Flight Mass Spectrometry* (ou MALDI-TOF MS). Le principe peut être subdivisé en 4 grandes étapes (***FIGURE 1.18***) : *soft-ionization* des macromolécules contenues dans l'échantillon par ajout d'une matrice afin organique afin de co-cristalliser ce dernier, accélération des ions formés grâce à un champ électrique, séparation des ions selon leur rapport masse/charge et détection des ions par un détecteur chargé de transformer le courant ionique en courant électrique. *In fine*, le processus génère un spectre qui est comparé à une DB, ce qui donne un score de similitude compris entre 0 et 3 (*Descy et al., 2010*). D'une efficacité redoutable pour l'identification des bactéries et des levures, le MALDI-TOF MS se heurte néanmoins à certaines difficultés lorsqu'il s'agit d'identifier les champignons filamenteux. La première de ces difficultés est inhérente aux dermatophytes. D'une manière générale, il reste difficile de discriminer des espèces dont le profil moléculaire est semblable. En ce qui concerne les dermatophytes, tel qu'expliqué dans les points précédents, les espèces anthropophiles sont des champignons dont l'évolution est relativement récente. De ce fait, les différentes espèces n'ont pas encore eu le temps de diverger suffisamment et ont, dès lors, des marqueurs de diagnostic assez proches les uns des autres (*De Hoog et al., 2021*). La seconde difficulté concerne le prélèvement de la souche : puisque cette analyse est basée sur le profil moléculaire, il est nécessaire de veiller à la bonne séparation du dermatophyte et de son milieu de culture. Dans le cas contraire, le spectre obtenu est faussé puisque le milieu de culture génère lui-même des pics parasites, ce qui donne des scores très faibles lors de la comparaison aux spectres contenus dans la DB. Actuellement, le MALDI-TOF MS fait office de *gold standard* pour l'identification des espèces en bactériologie. A l'inverse, pour la mycologie, son utilisation a démontré un manque de résolution pour la distinction des espèces proches. Dans ce cadre précis, son utilisation tend à disparaître au profit de l'étude du profil génétique par biologie moléculaire.

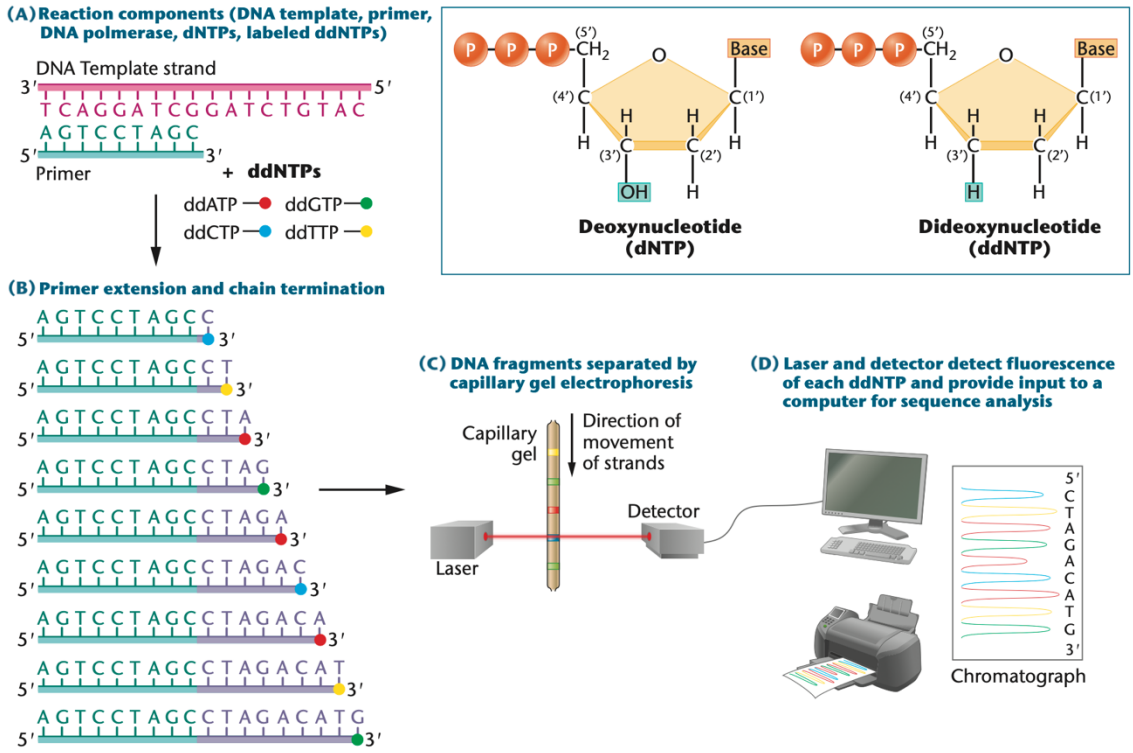


FIGURE 1.19. Séquençage selon la méthode de Sanger et Coulson automatisée par ordinateur

A. L'ADN est tout d'abord dénaturé. Une amorce est ensuite hybridée à la séquence ADN d'intérêt. Une ADN polymérase, une forte concentration de dNTPs non-marqués et une faible concentration de ddNTPs marqués sont ajoutés au tube de réaction. Les 4 types de ddNTPs sont marqués par un fluorochrome propre à chaque type (jaune pour la thymine, rouge pour l'adénine, vert pour la guanine et bleu pour la cytosine). ***B.*** L'ADN polymérase effectue une élongation de l'amorce préalablement hybridée et incorpore aléatoirement un ddNTP au lieu d'un dNTP. A l'inverse des dNTPs, les ddNTPs ont un hydrogène et non un groupement hydroxyle au carbone n°3. Cette particularité rend impossible l'ajout d'un nucléotide et engendre dès lors un arrêt de l'élongation. Le caractère aléatoire de cette insertion implique que statistiquement, la réaction produira n fragments différents, où n correspond à la taille du segment d'ADN devant être séquencé. Le résultat est une population de fragments terminant tous par un ddNTP et qui diffèrent, en termes de taille, d'un seul nucléotide. ***C.*** Ces fragments sont séparés selon leur taille par une électrophorèse capillaire. Un laser traverse ce capillaire et un détecteur détecte la couleur de la fluorescence émise par le fluorochrome qui marque le ddNTP en dernière position du fragment. ***D.*** Le détecteur envoie les données à un ordinateur, qui génère un chromatogramme à l'aide de 4 courbes, chaque courbe correspondant à un type de ddNTP. La séquence du brin est construite en démarrant de l'extrémité 3' (ce qui correspond aux plus petits fragments issus de l'électrophorèse capillaire). Chaque fois qu'une courbe marque un pic, l'ordinateur ajoute à la séquence la base correspondant à la couleur du pic. Cette opération génère un fichier unique à extension .ab1 qui regroupe à la fois les courbes et la séquence de l'ADN étudié.

SOURCE : Klug et al., 2020

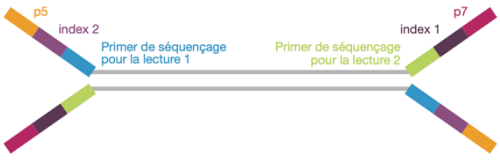


FIGURE 1.20. Structure des adaptateurs Illumina utilisés

Les adaptateurs sont formés de 3 régions : une région interne complémentaire aux primers de séquençage (en bleu pour la lecture R1 et vert pour la lecture R2), une région externe complémentaire aux oligonucléotides fixés sur la FC (en orange) et entre les deux, une région « index » jouant le rôle de code-barre (en mauve) permettant, dans les étapes ultérieures, de retrouver à quel échantillon appartient ce *read*.

SOURCE : Illumina Cambridge Ltd., 2020

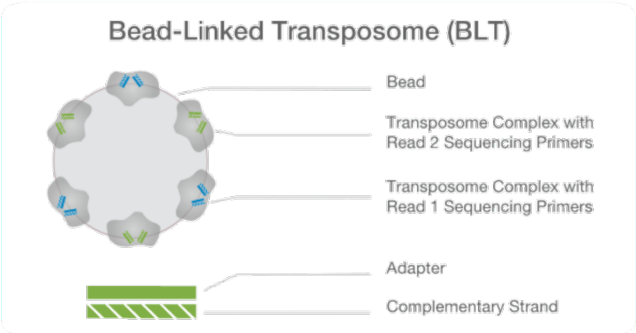


FIGURE 1.21. Représentation schématique d'un transposome

Les transposomes intègrent 2 adaptateurs de séquençage distincts (R1 et R2, ce qui explique pourquoi 2 fichiers sont générés pour une seule et même souche séquencée). Ces transposomes ont pour support des billes.

SOURCE : Illumina Cambridge Ltd., 2020

1.5.6. Examen du profil génétique par biologie moléculaire

Ces méthodes permettent une identification fiable et applicable à tous les microorganismes, y compris ceux qui sont difficilement cultivables. Dans le cadre du diagnostic des dermatophytes, elle permet l'identification des souches stériles et/ou atypiques qui ne sporulent pas. Tel que mentionné dans les points précédents, l'identification moléculaire des dermatophytes au laboratoire du CHU de Liège est basée sur le séquençage de la région ITS (et plus précisément, la région ITS2, qui contient plus de sites variables que l'ITS1). Ce segment d'ADN est transcrit sans être traduit, d'où son appellation. La première étape consiste à extraire l'ADN des dermatophytes. Pour cela, des méthodes automatisées ont été mises au point. Puisqu'il s'agit d'un séquençage à faible débit (nécessitant donc une grande quantité d'ADN pour être mené à bien), la première étape consiste à amplifier spécifiquement la région ITS2. Le séquençage est ainsi réalisé sur les amplicons et non sur l'ADN génomique. La séquence obtenue est ensuite alignée au sein de la DB du WI et l'espèce est identifiée sur base de la similitude des séquences. Cette méthode est fréquemment utilisée en pratique du fait de son rapport efficacité/facilité de mise en place. Elle nécessite cependant une mise en culture du dermatophyte au préalable, ce qui ralenti considérablement la finalisation du résultat de l'identification. Pour pallier cela, une PCR multiplex en temps réel a été développée par la firme Pathonostics sous l'appellation PCR DermaGenius. Cette dernière permet l'identification directe des dermatophytes à partir des prélèvements d'ongles, de peau et de cheveux. Elle permet ainsi de pallier la faible sensibilité de la culture ainsi que le délai de croissance assez long nécessaire pour certaines souches (*T. verrucosum*, entre autres). Cependant, bien que fréquemment utilisées en pratiques, ces deux techniques font face à certaines limitations lorsqu'il s'agit d'identifier certaines espèces. Pour ce qui est des dermatophytes, ces difficultés concernent principalement les espèces *T. interdigitale/mentagrophytes/indotineae* ainsi que les espèces *T. rubrum/violaceum/soudanense*. Ces difficultés sont inhérentes à la région ITS2 : du fait de sa taille relativement petite, cette région seule ne possède pas la résolution nécessaire pour pouvoir distinguer efficacement des espèces génétiquement proches. C'est de ces limitations qu'est né le besoin d'outils capables d'investiguer le profil génétique des dermatophytes de manière plus exhaustive que ne le fait une PCR, qui se retrouve cantonnée à l'amplification du seul segment pour lequel les amorces ont été conçues. L'une des pistes qui a dès lors été envisagée est le *whole genome sequencing* (*WGS*). Avant de détailler la technique derrière le WGS, il est primordial de retracer l'historique du séquençage de l'ADN, mettant ainsi en lumière les limitations de chaque génération afin de mieux comprendre l'origine des techniques actuelles et les *challenges* des techniques à venir.

1.5.6.1. Séquençage de première génération

C'est à la fin du 20ème siècle que les premières techniques de séquençage furent mises au point. Deux approches différentes ont vu le jour simultanément : le séquençage selon la méthode de Maxam et Gilbert (*Maxam & Gilbert, 1977*) ainsi que le séquençage selon la méthode de Sanger et Coulson (*Sanger & Coulson, 1975*). La première fut progressivement remplacée par la seconde, plus sûre et plus facile à mettre en place. Encore très utilisé aujourd'hui sous sa forme automatisée par ordinateur pour gagner en robustesse, cette technique demeure limitée aux fragments de petite taille. Elle repose actuellement sur l'utilisation de didéoxynucléotides triphosphates (ddNTP), une forme modifiée des dNTP qui ont la particularité de terminer la réaction de polymérisation lorsqu'ils sont insérés au sein d'un brin d'ADN. En combinant dNTP et ddNTP dans le milieu réactionnel, il en résulte une compétition entre ces derniers, ce qui forme des fragments d'ADN de différente taille (statistiquement, toutes les tailles possibles). En séparant ces fragments par chromatographie couplé à un laser, il est possible de déterminer la séquence du fragment en partant du plus petit d'entre eux (***FIGURE 1.19***). Dans les faits, cette technique fût utilisée pour séquencer la quasi-totalité du génome humain. Cependant, il a fallu 13 ans d'efforts communs de plusieurs dizaines de laboratoires à travers le monde et près de 3 milliards USD pour séquencer ce dernier. Plusieurs limitations caractérisent cette méthode : son coût exorbitant, son faible débit et, dans une certaine mesure, la nécessité de démarrer avec un échantillon d'ADN fortement concentré. En pratique, l'ADN subit une amplification par PCR avant l'étape de séquençage. Cette amplification introduit néanmoins des mutations au sein de l'ADN, conduisant à des résultats biaisés.

1.5.6.2. Séquençage de deuxième génération

Pour pallier les 2 limitations principales du séquençage de première génération (faible débit et coût élevé), un ensemble de technologies de séquençage de seconde génération, regroupées sous l'appellation « next-generation sequencing (NGS) » ont émergé au début du 21ème siècle. En réalité, ce terme générique ne fait pas référence à un principe en particulier, il englobe différentes techniques qui partagent néanmoins deux points commun : elles nécessitent toutes une forte quantité d'ADN pour démarrer le processus de séquençage et elles impliquent toutes une amplification par PCR à un moment ou à un autre du processus. Cette dernière n'étant jamais fiable à 100%, toutes les technologies dites de « deuxième génération » sont sujettes à un biais d'amplification dû à l'introduction d'erreurs au sein des séquences durant l'étape de PCR. Ces erreurs peuvent être interprétées à tort comme étant un *single nucleotide polymorphism* (SNP) lors des analyses bio-informatiques en aval. Fort heureusement, il existe des solutions logicielles pour corriger ces erreurs lors de l'étape d'assemblage du génome (*Dorado et al., 2019*).

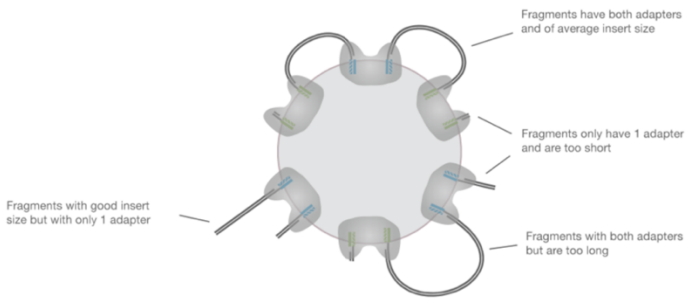


FIGURE 1.22. Principe de la tagmentation

Issu de la concaténation des termes « tag » et « fragmentation », la tagmentation fait référence à une méthode qui permet à la fois de fragmenter et marquer l'ADN. La tagmentation sur billes utilise des transposomes liés aux billes pour obtenir une réaction de tagmentation plus uniforme par rapport à la tagmentation en solution. Une fois que les transposomes liés aux billes sont saturés d'ADN, aucune tagmentation supplémentaire ne peut se produire. Ceci agit ainsi comme une étape de normalisation.

SOURCE : Illumina Ltd., 2020

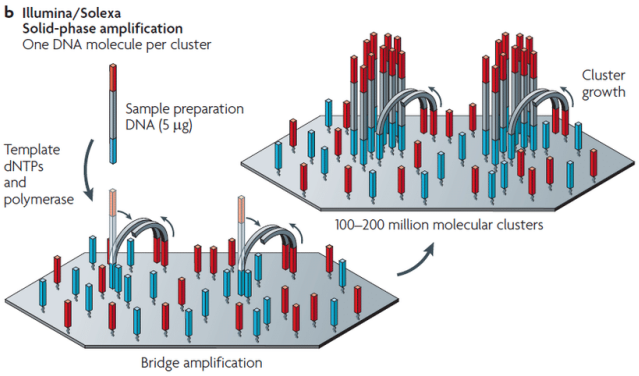


FIGURE 1.23. Création des *clusters* sur le support de séquençage

La création des clusters sur la FC (ou support de séquençage) se base sur le processus de *bridge amplification* (également appelée PCR en pont). Lorsqu'un brin d'ADN marqué est transféré sur le support de séquençage, une interaction avec les amorces présentes sur ce support permettent son immobilisation. Une polymérase crée alors un brin complémentaire du brin matrice. Tandis que le brin matrice est éliminé par dénaturation, le brin complémentaire néosynthétisé est fixé au support. Puisque ce dernier contient un adaptateur au second type d'amorce présentes sur le support de séquençage à son extrémité distale (libre), le brin se replie de sortes qu'il puisse former un pont. Une nouvelle étape de polymérisation génère le brin complémentaire. Il existe une différence avec la première étape de polymérisation : après dénaturation, tant le brin matrice que le brin complémentaire néosynthétisé sont fixés au support de séquençage. Chacun de ces brins se courbe à nouveau pour former un pont, ce qui redonne lieu à une troisième étape de polymérisation. Cette amplification clonale se poursuit et permet de générer des millions de clusters.

SOURCE : Metzker, 2010

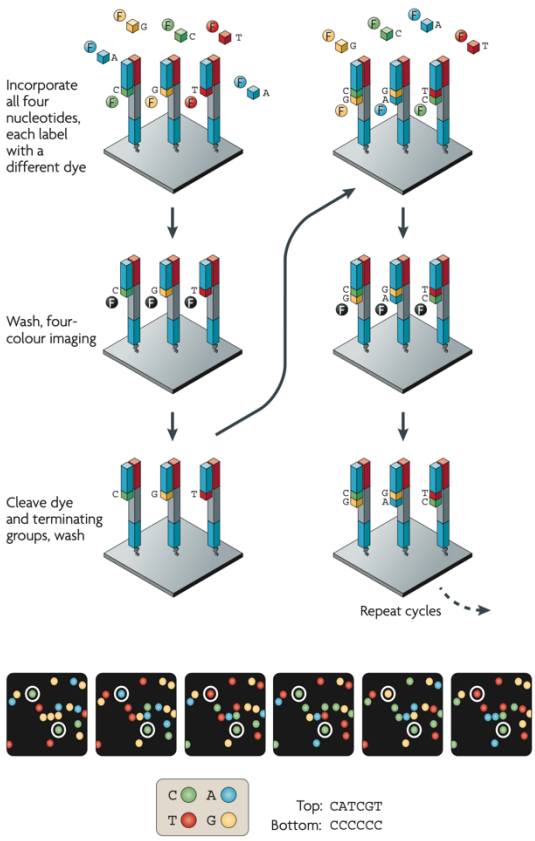


FIGURE 1.24. Principe du séquençage par terminateurs réversibles

Lorsque les clusters sont créés, l'étape suivante consiste à en déterminer la séquence. La méthode Illumina est basée sur l'utilisation de nucléotides à caractère terminateur réversible (technologie 3'-O-azidomethyl). Durant la phase de séquençage, une polymérase synthétise le brin complémentaire du brin matrice fixé au support de séquençage. Dès qu'un nucléotide marqué est incorporé dans ce brin complémentaire, un lavage élimine tous les autres du milieu. La réaction s'arrête (puisque le nucléotide incorporé ne possède pas le 3'-OH nécessaire pour effectuer la liaison à un autre nucléotide) et le signal lumineux est capturé. Le fluorochrome est clivé puis éliminé grâce à une nouvelle étape de lavage en utilisant un agent réducteur, le tris(2-carboxyethyl)phosphine (également appelé TCEP). Ce traitement permet de restaurer le groupe 3'-OH du nucléotide dernièrement incorporé, ce qui réenclenche la polymérisation. Le cycle débute à nouveau.

SOURCE : Metzker, 2010

A ce jour, 4 technologies ont été décrites sous l'appellation « technologies de séquençage de deuxième génération » : l'*Emulsion-PCR Sequencing* de 454 Life Sciences (*Margulies et al., 2005*), filiale de Roche depuis la fusion-acquisition de 2007, la *Reversible-Terminator Sequencing* d'Illumina (*Bentley, 2006*), la *Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection* (*Valouev et al., 2008*) et l'Ion Torrent Chip Sequencing (*Rothberg et al., 2011*), toutes les deux commercialisées par Life Technologies, filiale de Thermo Fisher Scientific depuis la fusion-acquisition de 2013. Les concepts qui sous-tendent l'apparition de ces technologies diffèrent selon la technique considérée. Tandis que la méthode Illumina se base sur le séquençage par synthèse (*Mitra et al., 2003*), la méthode de Roche est tournée vers le pyroséquençage (*Ronaghi et al., 1998*), Thermo Fisher Scientific se basent quant à eux sur 2 technologies : le séquençage par ligation (*Shendure et al., 2005*) mais également le séquençage sur puces à semi-conducteurs (*Rothberg et al., 2011*). Seule la technologie Illumina sera détaillée dans ce chapitre. La première étape consiste à fragmenter aléatoirement l'ADN, formant des fragments dont la taille varie de 200 à 500 pb. Il existe plusieurs manières d'y parvenir : la sonication, la nébulisation ou encore la digestion enzymatique. L'étape suivante consiste à ajouter des adaptateurs aux extrémités de ces fragments (**FIGURE 1.20**). Ces derniers sont ensuite amplifiés par PCR. Il existe une technique plus récente qui permet la préparation des librairies : la tagmentation (**FIGURES 1.21 & 1.22**). Il s'agit d'une réaction à médiation transposomique qui combine le marquage et la fragmentation de l'ADN en une seule réaction. De plus, cette méthode n'implique aucune amplification par PCR et permet, dès lors, de supprimer le biais induit par celle-ci lors de la préparation des librairies (*Illumina Cambridge Ltd., 2020*). Les fragments simple-brin marqués résultant de l'étape précédente sont disposés sur la *flow-cell*. Grâce aux adaptateurs présents à leur extrémité, les fragments s'hybrident aux oligonucléotides fixés à ce support. Une ADN polymérase synthétise ensuite le brin complémentaire de ce fragment, formant un ADN double-brin. Ce dernier est dénaturé et une étape de lavage permet d'éliminer le brin original. Ceci permet en quelques sortes de « transférer » la séquence depuis le brin d'ADN original (qui est libre) vers la séquence d'oligonucléotides fixée à la *FC*. Cet unique brin d'ADN subira une amplification clonale. Pour cela, il se courbe de sorte que son extrémité distale libre (qui est en réalité un adaptateur contenant un site d'hybridation) puisse être en contact avec l'oligonucléotide le plus proche qui se trouve lui aussi fixé à la *FC*. Cet ADN forme dès lors un pont, d'où le nom du processus : la *bridge amplification*. À nouveau, une polymérase se lie à l'extrémité distale de l'ADN simple-brin tout juste fixée à la *FC* et en synthétise le brin complémentaire qui, dans les faits, est un brin inversé. Ces 2 brins sont ensuite dénaturés, et le processus est répété des dizaines de fois jusqu'à générer des clusters (*forward* et *reverse*) résultant de l'amplification clonale d'un unique fragment d'ADN. Les brins *reverse* sont ensuite clivés et éliminés pour ne garder que les brins *forward* (**FIGURE 1.23**). Le séquençage par synthèse est basé sur l'utilisation de nucléotides marqués par 4 fluorochromes distincts. A l'image du séquençage selon la méthode de Sanger et Coulson, ce fluorochrome confère un caractère dideoxy-terminateur-*like* aux nucléotides qui le portent. Ce caractère est néanmoins temporaire dans la mesure où il est possible de cliver le fluorochrome par traitement chimique. Il redevient alors possible de lier un nouveau nucléotide à la suite du nucléotide initialement terminateur. La première étape consiste à initier le séquençage en hybridant un *primer* à sa région complémentaire, présente au sein des adaptateurs liés aux extrémités des fragments. Toutes les conditions sont alors réunies pour que débute la synthèse du brin complémentaire en partant de ce *primer*. L'insertion du premier nucléotide arrête la réaction du fait de son caractère dideoxy-terminateur-*like*. Après une étape de lavage, un laser excite le fluorochrome du nucléotide inséré et une caméra enregistre la couleur de la fluorescence émise. Cette dernière est spécifique de la nature du nucléotide. Lorsque le signal est enregistré, un traitement chimique permet de cliver le fluorochrome et un lavage permet de l'éliminer. Le cycle suivant peut alors débuter et sera répété jusqu'à ce que le dernier nucléotide soit séquencé : la séquence ainsi obtenue forme un *read* (**FIGURE 1.24**).

1.5.6.3. Séquençage de troisième génération

Le séquençage de troisième génération regroupe des technologies capables de séquencer un brin entier et unique d'ADN, avec ou sans amplification au préalable (*von Bubnoff, 2008*). Parmi celles-ci figurent le *True Single-Molecule Sequencing* d'Helicos BioSciences (*Harris et al., 2008*), le *Single-Molecule Real Time Sequencing* de Pacific Biosciences (*Eid et al., 2009*), la *Combinatorial Probe-Anchor Ligation* de Complete Genomics (*Drmanac et al., 2010*) ou encore la Nanopore Sequencing d'Oxford Nanopore Technologies (*Stoddart et al., 2010*). Seule cette dernière sera détaillée au sein de ce chapitre. Conceptualisée en 2010 puis commercialisée cinq ans plus tard, cette technologie est aujourd'hui considérée comme appartenant à une nouvelle génération d'outils de séquençage du fait d'une différence majeure avec les 2 générations qui la précédent : elle ne fait appel à aucun processus de synthèse d'acides nucléiques (**FIGURE 1.25**). La résultante de ceci est la suppression du biais d'amplification dû à la PCR ainsi que la possibilité de séquencer des fragments d'ADN beaucoup plus longs. Ceci facilite l'étape d'assemblage des génomes et permet de réduire fortement la fragmentation des génomes assemblés. L'autre nouveauté de cette technologie réside dans la taille de l'appareil, qui tient littéralement dans une main à l'inverse des appareils commercialisés par ses concurrents. Ceci ouvre la porte au séquençage sur le terrain, s'affranchissant de toutes les contraintes logistiques et pré-analytiques liées au transport des échantillons et/ou de l'ADN depuis son lieu de prélèvement vers le laboratoire où le séquençage est effectué. Dans les faits, ceci n'a que peu d'intérêt lorsqu'il est question de rechercher des mutations dans des cellules tumorales. Cela étant, cet outil prend tout son sens en microbiologie, et plus particulièrement lorsqu'il s'agit d'identifier et/ou d'effectuer un typage moléculaire rapide lors d'études environnementales (*Walter et al., 2017*).

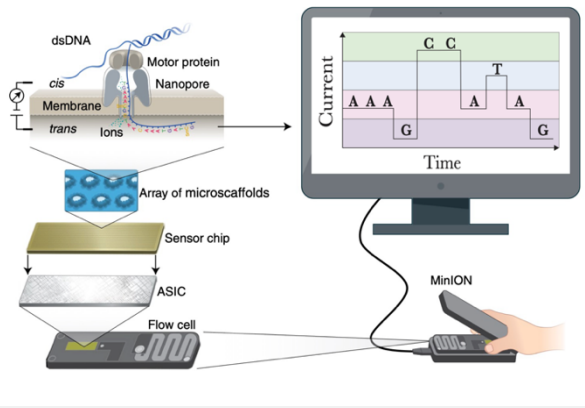


FIGURE 1.25. Principe de séquençage selon la méthode Nanopore

Les nanopores sont insérés dans une membrane synthétique. Ces derniers sont reliés à un détecteur capable de mesurer la tension de chacun des nanopores individuellement. L'ADN double-brin est déroulé grâce à une protéine motrice à activité hélicase, il en résulte 2 brins distincts. L'un d'eux est guidé par cette même protéine motrice (mais aussi par affinité électrique, puisque la face *trans* est chargée positivement) afin qu'il puisse atteindre un nanopore. Lorsqu'un nucléotide traverse le nanopore, une variation de courant ionique est mesurée. Cette variation étant caractéristique de la nature du nucléotide (et de manière plus générale, de la taille de la molécule qui se trouve au sein du nanopore à un instant t), il est possible de déterminer la séquence du brin et ce, avec un débit de 450 bases par seconde. Puisque le séquençage est basé sur la taille, il est possible de séquencer non seulement de l'ADN/ARN mais aussi des protéines grâce à cette technologie.

SOURCE : Wang et al., 2021

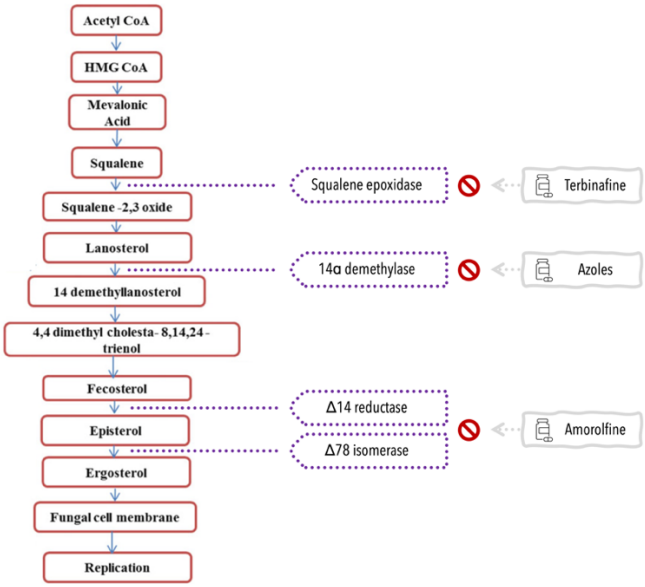


FIGURE 1.26. Biosynthèse de l'ergostérol et cibles enzymatiques

L'ergostérol est un composant essentiel des membranes chez les champignons. Les allylamines (dont fait partie la terbinafine) cible la SQLE, l'enzyme responsable de la conversion du squalène en squalène époxyde. Les composés azolés (dont font partie l'itraconazole et le fluconazole) agissent en aval, bloquant la lanostérol en 14 déméthyl-lanostérol. Les morpholines (dont fait partie l'amorolfine) bloquent à la fois la conversion du fécostérol en épistérol et la conversion de l'épistérol en ergostérol. La griséofulvine inhibe quant à elle l'agrégation des microtubules lors de la division cellulaire, empêchant ainsi la réplication du dermatophyte.

TABLEAU 1A. Principaux traitements antifongiques et leurs mécanismes d'action

Classe	Molécule	Voie d'administration	Mécanisme d'action
Allylamine	Terbinafine	Topique & systémique	Inhibition de la squalène époxydase
Azolés	Fluconazole	Systémique	Inhibition de la lanostérol-14-α-déméthylase
	Itraconazole		
	Bifonazole	Topique	
	Éconazole		
	Fenticonazole		
	Isoconazole		
	Kétoconazole		
	Miconazole		
	Omoconazole		
	Oxiconazole		
	Sertaconazole		
	Tioconazole		
Benzohydrofurane	Griséofulvine	Systémique	Blocage de la division cellulaire en métaphase
Hydroxypyridone	Ciclopirox	Topique	Chélation des cations métalliques trivalents et inhibition de la chaîne respiratoire
Morpholine	Amorolfine	Topique	Inhibition de la Δ14-réductase & Δ8,7-isomérase

SOURCE : Etcheverria, 2022

Il en résulte un gain de temps considérable, d'autant plus que cette technologie, à l'inverse de ses concurrents, affiche les données de séquençage en temps réel, offrant la possibilité d'arrêter le processus dès que l'opérateur juge suffisante la quantité d'informations génomiques extraites. Réelle révolution dans le milieu du séquençage, cette technologie est néanmoins entachée d'un taux d'erreur plus élevé que les technologies de deuxième génération (pouvant atteindre les 15%). De nombreuses mises au point sont en cours, tant sur les kits utilisés pour la préparation de l'ADN que sur les algorithmes permettant l'analyse des données. Ces mises au point permettront, *in fine*, de fiabiliser cette technologie (*Bernard, 2021*).

1.6. Traitements antifongiques

Du fait de la proximité des cellules humaines et des cellules fongiques (**FIGURE 1.01**), les solutions thérapeutiques qui s'offrent au médecin pour soigner un patient atteint de dermatophytose sont limitées. Plusieurs molécules à activité antifongique existent à ce jour mais ces dernières peinent à passer les tests de toxicité lors des essais cliniques. Certaines sont commercialisées puis retirées du marché, à l'image de la griséofulvine, successivement retirée du marché belge en 1997 puis du marché français en 2021. D'une manière générale, les traitements des dermatophytoses sont longs et ont une rémanence élevée. De nombreux facteurs entrent en jeu lorsqu'il s'agit de choisir un traitement adapté au patient. Parmi ceux-ci figurent la nature du dermatophyte responsable de la lésion, la localisation de celle-ci, son étendue ainsi que la tolérance du patient pour l'antifongique sélectionné. Malgré l'existence de nombreuses molécules (**TABLEAU 1A**), seules 3 d'entre-elles sont disponibles actuellement en Belgique pour le traitement des dermatophytoses : la terbinafine, le fluconazole et l'itraconazole. Des 3 molécules citées, seule la terbinafine possède un usage topique. Cependant, à l'instar du fluconazole et de l'itraconazole, la terbinafine est souvent administrée sous forme systémique. L'un des paramètres à prendre en compte pour le choix du traitement est l'affinité de la molécule pour la kératine. Ainsi, à l'inverse du fluconazole, la terbinafine et l'itraconazole possèdent une affinité élevée pour la kératine, constituant majeur de la peau, des poils et des ongles. Par conséquent, ces 2 dernières constituent les antifongiques de choix pour le traitement des mycoses superficielles. Bien qu'elles aient des cibles différentes, ces 2 molécules agissent au sein d'un seul et même processus : la biosynthèse de l'ergostérol chez le dermatophyte, constituant essentiel au maintien de la membrane sous-jacente à la paroi (**FIGURE 1.26**).

1.6.1. Terbinafine

Découverte en 1974, il faudra attendre presque 2 décennies pour voir apparaître cette molécule en Europe, où le Royaume-Uni fut le premier pays à autoriser sa commercialisation en 1991 (*Van Duyn Graham & Elewski, 2011*). Seule représentante actuelle des allylamines, elle permet l'inhibition non-compétitive de la SQLE, enzyme clé dans la biosynthèse de l'ergostérol. La terbinafine possède une activité principalement fongicide en ce qui concerne les dermatophytes, bien qu'une activité fongistatique ait été montrée chez certaines espèces de levures (*Gupta et al., 2017*). En privant le dermatophyte d'ergostérol, la terbinafine empêche ce dernier de croître et de se diviser. Par ailleurs, l'inhibition de la SQLE entraîne une accumulation de squalène dans le cytosol, qui se met alors à former des vésicules lipidiques. Lorsque ces dernières entrent en contact avec la membrane plasmique, il en résulte une rupture de l'intégrité membranaire et de la perméabilité qui y est associée. La conséquence de ceci est la mort cellulaire. La terbinafine (**FIGURE 1.27**) est une molécule hydrosoluble et son temps de demi-vie assez long (24 à 156 jours) lui confère une rémanence élevée au sein des tissus. Par le passé, des études ont démontré l'efficacité supérieure de la terbinafine pour le traitement dermatophytoses, et plus particulièrement pour les espèces du genre *Trichophyton* (*Singh et al., 2018*).

1.6.2. Itraconazole et fluconazole

Synthétisées pour la première fois au début des années 1980, ces molécules (**FIGURES 1.28 & 1.29**) se sont vues commercialisées presqu'en même temps que la terbinafine. C'est plus précisément en 1992 que leur commercialisation fut autorisée aux États-Unis. Elles appartiennent à la classe thérapeutique des composés azolés et ciblent, à ce titre, la 14-α-déméthylase (codée par le gène CYP51 chez les champignons filamenteux), enzyme responsable de la déméthylation du lanostérol en 14-déméthyl-lanostérol (**FIGURE 1.26**). En privant le dermatophyte d'ergostérol, elles empêchent ce dernier de croître et de se diviser. Leur action est donc fongistatique. L'itraconazole possède un spectre d'action plus large que celui de la terbinafine. En plus d'être actif sur les dermatophytes, cet antifongique s'avère également efficace contre les champignons des genres *Aspergillus* et *Candida* (*Gupta et al., 2017*).

1.6.3. Griséofulvine

Cette molécule (**FIGURE 1.30**) figure parmi les plus anciens antifongiques à usage systémique de la liste. Elle n'est efficace que contre les dermatophytes, ce qui fait d'elle la molécule antifongique au spectre le plus étroit. Elle agit en interférant avec la polymérisation des microtubules durant la division cellulaire. Cette dernière ne pouvant avoir lieu en l'absence de faisceaux mitotiques, le processus s'arrête. Son action est donc qualifiée de fongistatique. A l'instar du fluconazole, la griséofulvine possède une faible affinité pour la kératine.

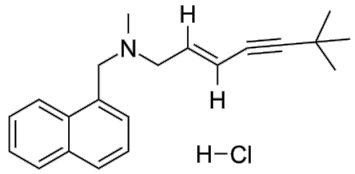


FIGURE 1.27. Structure de la terbinafine

Connu sous la dénomination UICPA *(2E)-N,6,6-triméthyl-N-(naphtalén-1-ylméthyl)hept-2-én-4-yn-1-amine*, cet antifongique est commercialisé sous l'appellation Lamisil.

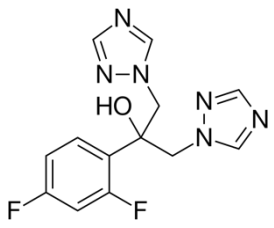


FIGURE 1.28. Structure du fluconazole

Connu sous la dénomination UICPA *2-(2,4-difluorophényl)-1,3-di(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propan-2-ol*, cet antifongique est commercialisé sous l'appellation Difulcan.

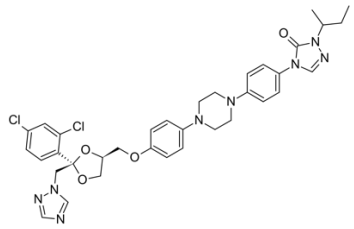


FIGURE 1.29. Structure de l'itraconazole

Connu sous la dénomination UICPA *(2R,4S)-rel-1-(butan-2-yl)-4--4,5-dihydro-1H-1,2,4-triazol-5-one*, cet antifongique est commercialisé sous l'appellation Sporanox.

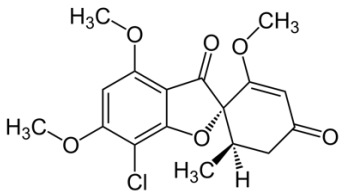


FIGURE 1.30. Structure de la griséofulvine

Connu sous la dénomination UICPA (2S,6'R)-7-chloro-2',4,6-triméthoxy-6'-méthyl-3H,4'H-spiro-3,4'-dione, cet antifongique fut commercialisé sous l'appellation Amudane.

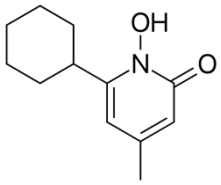


FIGURE 1.31. Structure du ciclopirox

Connu sous la dénomination UICPA 6-cyclohexyl-1-hydroxy-4-methylpyridin-2-one, cet antifongique fut commercialisé sous l'appellation Penlac.

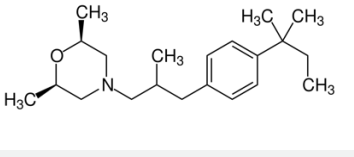


FIGURE 1.32. Structure de l'amorolfine

Connu sous la dénomination UICPA (±)-(2R*,6S*)-2,6-diméthyl-4-morpholine, cet antifongique fut commercialisé sous l'appellation Loceryl.

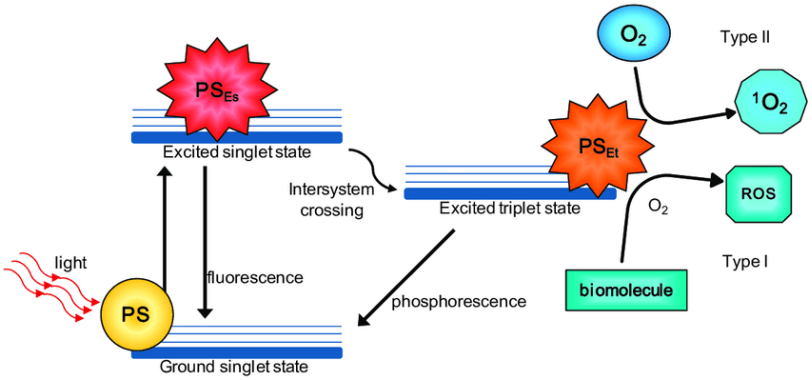


FIGURE 1.33. Principe de la thérapie photodynamique

L'agent photosensibilisant (PS) est excité par un rayon de longueur d'ondes définie. Il est ensuite capable de transmettre cette énergie à l'oxygène ou aux biomolécules environnantes, formant ainsi des composés toxiques qui finissent par tuer la cellule.

SOURCE : Calixto et al., 2016

Les thérapies de longue durée qui sont basées sur son usage sont ainsi peu recommandées et d'autres molécules, comme la terbinafine ou l'itraconazole, lui sont préférées dans ce cas spécifique. Longtemps présente au sein de la palette d'antifongiques du mycologue (et surtout en ce qui concerne le traitement des *Tinea capitis*), la griséofulvine a vu son autorisation de mise sur le marché suspendue en 1997 en Belgique et pour cause, certaines études ont démontré de potentiels effets tératogènes à fortes doses chez l'animal. Chez les voisins Français, le laboratoire Sanofi-Aventis a continué de commercialiser la molécule jusqu'en mars 2021, évoquant alors des « difficultés liées à la fabrication » pour justifier l'arrêt de sa commercialisation.

1.6.4. Ciclopirox

Cette molécule (***FIGURE 1.31***) fait partie de la classe des hydroxypyridones (***TABLEAU 1A***). Contrairement aux allylamines et aux dérivés azolés, celle-ci n'affecte pas la biosynthèse de l'ergostérol. Au sein du dermatophytes, certaines métalloprotéinases sont chargées de la clairance du peroxyde, produit de dégradation toxique pour la cellule fongique. Le ciclopirox, en chélatant les cations métalliques trivalents, inhibe ces métalloprotéinases, ce qui résulte en une accumulation de peroxyde induisant la mort cellulaire. Par ailleurs, cette molécule agit également sur le métabolisme énergétique du dermatophyte en inhibant la pompe sodium-potassium. Indiqué pour le traitement des onychomycoses, cet antifongique à usage topique est commercialisé sous forme de vernis.

1.6.5. Amorolfine

Indiquée pour le traitement des onychomycoses, l'amorolfine (***FIGURE 1.32***) est un antifongique de la classe des morpholines découvert au début des années 1980. En plus d'inhiber 2 enzymes impliquées dans la biosynthèse de l'ergostérol (***TABLEAU 1A***), cette molécule inhibe la chitine synthase et interfère avec le métabolisme énergétique du dermatophyte. Elle possède un spectre d'action assez large, mais elle n'est cependant pas efficace contre les *Aspergillus* et les *Fusarium*.

1.6.6. Thérapie photodynamique

Pour traiter les dermatophytoses, il existe à ce jour certaines alternatives aux traitements médicamenteux. Parmi celles-ci, la thérapie photodynamique (***FIGURE 1.33***) a récemment été citée dans la littérature. Longtemps utilisée pour traiter les mélanomes, cette dernière s'avère efficace pour traiter les dermatophytoses résistantes aux traitements conventionnels. La méthode est basée sur l'utilisation d'un agent photosensibilisant non-toxique qui ne réagit qu'à certaines longueurs d'ondes. Lorsqu'il est administré, cet agent pénètre en premier lieu dans les cellules à métabolisme élevé. Il en résulte donc une certaine sélectivité vis-à-vis des tissus sains. Lorsqu'il est excité, l'agent photosensibilisant réagit avec l'oxygène pour former des radicaux libres (réaction de type I) ou des dérivés oxygénés (réaction de type II), tous deux cytotoxiques. La cellule où se déroule le processus fini donc par mourir sous l'effet de ces substances cytotoxiques. Dans une étude parue en 2021, des chercheurs ont utilisé le bleu de méthylène en tant qu'agent photosensibilisant combiné à la thérapie photodynamique. Cette combinaison a démontré son efficacité pour le traitement de deux espèces de dermatophytes, le *T. rubrum* et le *T. interdigitale*. De manière assez intéressante, ce traitement semble efficace tant contre les souches sensibles que celles qui s'avèrent résistantes à la terbinafine et ce, indépendamment du type de mutation impliqué dans le gène de la SQLE (*Shen et al., 2021*).

1.6.7. Autres thérapies prometteuses

L'émergence de phénomènes de résistance aux antifongiques actuels a été l'un des nombreux facteurs qui ont contribué à l'augmentation de la demande pour de nouvelles alternatives thérapeutiques. A l'heure actuelle, différentes pistes sont exploitées et il est difficile d'en établir une liste exhaustive. Certaines de ces pistes visent à mettre au point de nouvelles molécules : trois d'entre-elles seront citées. La première est la L-lysine éthanolate de fosravuconazole (*Watanabe et al., 2018*), une prodrogue du ravuconazole dont le développement avait été abandonné quelques années auparavant. Commercialisée au Japon depuis 2018 et indiquée pour le traitement des onychomycoses, cette molécule est malheureusement absente du marché Européen à l'heure actuelle. La seconde est le VT-1161, renommé oteseconazole. Molécule appartenant à la classe des tétrazole, il s'agit du premier traitement indiqué pour les mycoses vulvo-vaginales récidivantes. En pratique, cette molécule a également été testée pour le traitement des onychomycoses et a montré un taux de guérison d'approximativement 60% (*Gupta & Stec, 2019*). Le 28 avril 2022, la *Food and Drug Administration* (*FDA*) a officiellement autorisé la commercialisation de l'oteseconazole sur le sol américain. La dernière molécule, temporairement dénommée ME1111, est toujours en cours de mise au point. Il s'agit d'un nouvel antifongique topique, toujours conçu pour le traitement des onychomycoses. Le mécanisme d'action de cette molécule est quelque peu innovant puisqu'elle inhibe la succinate déshydrogénase, molécule essentielle pour la balance énergétique du dermatophyte (*Takahata et al., 2015*).

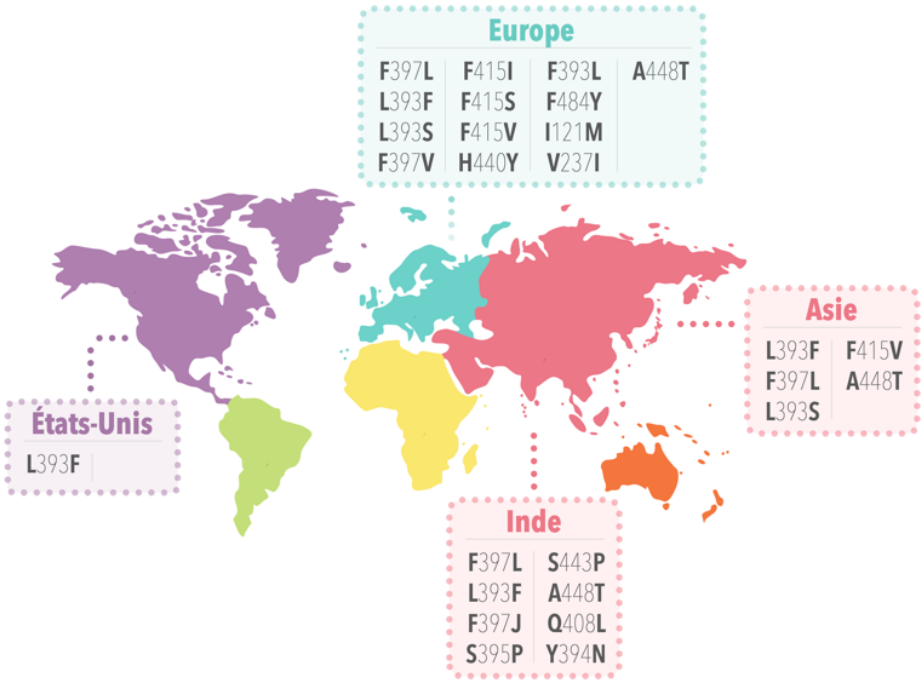


FIGURE 1.34. Distribution mondiale des mutations de la squalène époxydase

Les mutations L393F et F397L sont les plus fréquentes à travers le monde.

SOURCE : Sacheli & Hayette, 2021

TABLEAU 1B. Transporteurs impliqués dans la résistance aux dérivés azolés

Locus	Nom	Type	Voriconazole	Itraconazole	Kétoconazole	Fluconazole	Miconazole
TERG_02508	TruMDR1	ABC	✓	✗	✗	✓	✓
TERG_08613	TruMDR2	ABC	✗	✓	✗	✗	✗
TERG_02186	TruMDR3	ABC	✓	✓	✓	✓	✓
TERG_04952	TruMDR5	ABC	✗	✓	✗	✗	✗
TERG_01623	TruMFS1	MFS	✓	✓	✓	✓	✓
TERG_08336	TruMFS2	MFS	✓	✗	✗	✓	✗

SOURCE : Monod et al., 2021

1.7. Mécanismes de **résistance** aux antifongiques

Antifongique de choix et seul médicament indiqué chez l'enfant dans le traitement des teignes, la griséofulvine fut progressivement remplacée par une stratégie thérapeutique combinant terbinafine et l'itraconazole. Efficace dans un premier temps, cette approche laisse entrevoir ses faiblesses avec l'apparition des premiers cas de résistance à la terbinafine en 2003 (*Mukherjee et al., 2003*). Les cas de résistance (aux dérivés azolés, mais surtout à la terbinafine) se sont multipliés au fil des années qui ont suivi. Ces cas de résistance découlent de deux mécanismes distincts : l'un implique des mutations faux-sens dans le gène codant la SQLE et confère une résistance à la terbinafine tandis que l'autre, médié par des pompes à efflux ATP-dépendantes présentes dans la membrane des dermatophytes, confère une résistance aux dérivés azolés. Ces phénomènes de résistance se sont transformés en véritable menace de santé publique. Depuis 2018, une épidémie de variants résistants à la terbinafine sévit dans le nord de l'Inde. Il a été rapporté que ces résistances sont détectées dans près d'un tiers des souches identifiées comme appartenant à l'espèce *T. interdigitale/mentagrophytes* (*Singh et al., 2018*).

1.7.1. Détermination de la sensibilité antifongique

Les méthodes actuellement disponibles pour étudier la sensibilité d'une souche de dermatophyte à un antifongique sont similaires à celles qui sont utilisées pour les bactéries et les levures. Elles sont basées sur la détermination d'un seul paramètre : la CMI. Ce paramètre reflète la plus petite concentration de la molécule étudiée capable d'inhiber à 50% (CMI_{50}) ou à 90% (CMI_{90}) la croissance de l'agent étudié. La valeur de CMI ainsi déterminée est comparée à celles qui sont contenues dans un référentiel contenant, pour chaque molécule, une valeur seuil. Si la CMI expérimentale est supérieure à la valeur seuil du référentiel, l'agent étudié est qualifié de « résistant » à la molécule étudiée. A l'inverse, il sera dit « sensible » si cette CMI expérimentale est inférieure à la valeur seuil. Bien qu'il existe actuellement différentes méthodes permettant la détermination de la CMI pour les bactéries, une seule d'entre-elles est validée pour les dermatophytes : la méthode de microdilution telle qu'elle a été définie par l'*European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST). La méthodologie expérimentale sera décrite de manière plus exhaustive dans la partie « matériel et méthodes » de ce travail.

1.7.2. Résistance à la terbinafine

Durant un moment, les chercheurs se sont demandé si les transporteurs *ABC/MFS* jouaient un rôle dans l'émergence de résistance à la terbinafine. Plus tard, des études ont infirmé cette hypothèse (*Kano, 2021*), renforçant par la même occasion l'idée selon laquelle la résistance à la terbinafine n'est médiée que par l'apparition de mutations faux-sens dans le gène codant la SQLE. Ces mutations induisent elles-mêmes un changement d'acide aminé à certaines positions de la protéine traduite. La SQLE, lorsqu'elle est mutée, n'est plus inhibée par la terbinafine et malgré la présence de cette molécule dans le milieu, la synthèse de l'ergostérol continue d'opérer, inhibant ainsi l'effet fongicide de la terbinafine. C'est lors d'une étude menée par le CNRML en 2020 sur les teignes du cuir chevelu que le premier cas de *T. mentagrophytes* résistant à la terbinafine a été détecté en Belgique. La souche isolée présentait la mutation F397L (*Sacheli et al., 2020*). D'autres mutations ont été découvertes à travers le monde (***FIGURE 1.34***).

1.7.3. Résistance aux dérivés azolés

Les phénomènes de résistance aux dérivés azolés sont quant à eux la conséquence d'une surexpression des gènes codant les transporteurs *ABC* ou encore les transporteurs *Major Facilitator Superfamily* (*MFS*) . Ces derniers sont en réalité des pompes d'efflux qui éjectent les molécules antifongiques (entre autres) du cytosol vers le milieu extracellulaire. Il existe chez les dermatophytes 39 types de transporteurs *ABC* et plus de 170 transporteurs MFS. Cependant, seuls 4 transporteurs *ABC* (TruMDR1, TruMDR2, TruMDR3 et TruMDR5) et 2 transporteurs *MFS* (TruMFS1 et TruMFS2) sont impliqués dans la résistance aux dérivés azolés (***TABLEAU 1B***).

1.7.4. Résistances croisées

Comme explicité précédemment, les transporteurs ABC/MFS ne sont, à priori, pas impliqués dans les phénomènes de résistance à la terbinafine. L'inverse n'est pas vrai : l'apparition de mutations au sein du gène SQLE semble bel et bien impliquée dans la résistance aux dérivés azolés. Certains auteurs ont récemment décrit une double mutation au sein de la SQLE (F397L combinée à la mutation A448T) qui est associée à une diminution de la sensibilité au fluconazole (*Ebert et al., 2020*). Poursuivant un raisonnement logique, les chercheurs ont voulu savoir si la mutation A448T seule pouvait d'une part induire une résistance au fluconazole et d'autre part, induire une résistance à la terbinafine. Les résultats des investigations furent assez surprenants : dans les faits, la mutation A448T seule n'est responsable ni de résistance à la terbinafine (*Burmester et al., 2020*) ni de résistance au fluconazole (*Kong et al., 2021*). Mais lorsqu'elle est associée à la mutation F397L, la mutation A448T confère à la souche la capacité de résister à la fois à la terbinafine et aux dérivés azolés. Néanmoins, le mécanisme exact demeure à ce jour inconnu.

OBJECTIFS
&
STRATÉGIE

2.1. Contexte et objectifs de l'étude

Les objectifs de cette étude seront divisés en 2 catégories : l'objectif principal et les objectifs secondaires. Néanmoins, pour une meilleure compréhension des objectifs, il est nécessaire de poser le contexte de l'étude au préalable.

2.1.1. Contexte de l'étude

Au cours des dernières années, le CNRML a mené plusieurs études épidémiologiques visant à établir la distribution nationale des dermatophytes. Certaines de ces études ont duré 1 an (*Sacheli et al., 2016*) tandis que d'autres se sont étalées sur 5 ans (*Sacheli et al., 2020*). Ces études ont permis de classer les dermatophytes du complexe *T. mentagrophytes* au second rang des dermatophytes les plus présents en Belgique. Jusqu'à récemment, ce complexe regroupait en réalité 2 espèces : *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale*. Ces espèces sont très difficiles à distinguer l'une de l'autre étant donné leur proximité génomique (***FIGURE 1.04***). Pour parvenir à malgré tout distinguer ces deux espèces, des règles empiriques ont été mises en place (***FIGURE 5.02***). Ces règles prennent en considération l'origine du prélèvement et permettent, en cas de doute quant à l'identification de l'espèce, de classer le dermatophyte au sein de l'espèce *T. interdigitale* ou *T. mentagrophytes*. Depuis 2018, l'Inde (et plus particulièrement les régions au nord du pays) connaît l'émergence d'une épidémie de dermatophytes hautement résistants à la terbinafine. Lorsque les chercheurs ont voulu identifier l'espèce responsable de cette épidémie, une étude taxonomique (*Tang et al., 2021*) combinant des données moléculaires, morphologiques et physiologiques a mis en lumière une espèce apparentée aux *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale*, mais néanmoins distincte. Cette nouvelle espèce, d'abord nommée *T. mentagrophytes* ITS type VIII, fut entre temps renommée *T. indotineae* comme l'ont proposé Kano et ses collègues 1 an auparavant (*Kano et al., 2020*). La Belgique n'est pas épargnée, puisqu'un premier cas de dermatophyte résistant à la terbinafine y a été détecté il y'a de cela 4 ans comme le rapporte l'étude rétrospective du CNRML publiée en 2020 (*Sacheli et al., 2020*). Depuis ce cas (détecté en 2018), d'autres cas ont depuis été détectés. Cependant, en l'absence d'outils suffisamment précis pour permettre une distinction entre les espèces du complexe *T. mentagrophytes*, ces dermatophytes résistants ne sont pas identifiés comme *T. indotineae*. De plus, les dermatophytes appartenant à cette espèce ne sont pas systématiquement résistants à la terbinafine, ce qui complique d'avantage leur identification. Les évènements de ces deux dernières années ont sans aucun doute souligné l'importance d'une veille sanitaire soutenue. À l'instar d'un SARS-CoV-2, ces dermatophytes résistants à la terbinafine peuvent très rapidement évoluer en problème de santé publique. De plus, malgré sa nature initialement zoophile, cette nouvelle espèce de dermatophyte semble se transmettre très facilement de manière interhumaine. Au niveau clinique, ces souches résistantes induisent des dermatophytoses étendues, impliquant un traitement de longue durée aux conséquences médicales et socio-économiques non négligeables. A ce jour, aucune étude n'a été menée en Belgique pour établir la prévalence de cette nouvelle espèce. Ceci peut être imputé aux difficultés auxquelles font face les laboratoires lorsqu'il s'agit de distinguer les espèces du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. En l'absence d'une méthode fiable pour l'identification de l'espèce *T. indotineae*, il est assez difficile d'en établir la distribution.

2.1.2. Objectif principal de l'étude

L'objectif principal de cette étude est la mise au point d'une méthode permettant la discrimination efficace des espèces qui forment le complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* sur base d'une collecte rétrospective des cas de *T. interdigitale/mentagrophytes* isolés entre 2015 et 2022 au CNRML. Cette méthode permettra par la suite de procéder à une étude nationale (prévue entre avril 2022 et avril 2023). Celle-ci permettra d'établir la prévalence de l'espèce *T. indotineae* en Belgique ainsi que de relever la proportion de souches résistantes à la terbinafine au sein de cette nouvelle espèce.

2.1.3. Objectifs secondaires de l'étude

Pour parvenir à mettre au point cette méthode d'identification, des dermatophytes originaires de divers horizons ont été sélectionnés au sein de la collection du CNRML. Tandis que certaines des souches qui forment cet échantillon datent de 2015, d'autres sont très récentes. Les objectifs secondaires de cette étude sont multiples :

1	Établir la proportion de souches résistantes à la terbinafine au sein de l'échantillon sélectionné pour l'étude.
2	Déterminer, au sein de ces souches résistantes, le type de mutations du gène de la SQLE présentes en Belgique. A ce jour, seules les mutations L397F et F393L ont été identifiées. L'enjeu est donc de savoir si d'autres mutations circulent en Belgique.
3	Mettre au point de manière optimale l'extraction et la purification de l'ADN des dermatophytes.
4	Mettre au point la stratégie d'assemblage *de novo* des génomes sur base des données de séquençage.

5	Mettre au point le typage moléculaire des dermatophytes par séquençage à haut-débit. Ceci permettra de déterminer les marqueurs présents au sein des dermatophytes du complexe *T. mentagrophytes / interdigitale / indotineae*. Le premier enjeu est donc de savoir si les marqueurs présents au sein de ces 3 espèces varient d'une espèce à l'autre. Le second enjeu est d'établir s'il y'a correspondance entre les souches détectées comme étant résistantes à la terbinafine par la méthode de référence (EUCAST E.Def 11.0) et celles qui le sont par séquençage à haut-débit.
6	Comprendre comment se classent phylogénétiquement les souches résistantes à la terbinafine. L'enjeu est de savoir si ces souches se rapprochent plus de l'espèce *T. mentagrophytes* ou à l'inverse, de l'espèce *T. interdigitale*.
7	Mettre au point une méthode de discrimination des espèces basée sur l'étude du génome entier.
8	Mettre au point une méthode de discrimination des espèces basée sur l'étude d'un seul gène. L'enjeu ici est d'identifier un gène qui, analysé selon une certaine méthodologie, permettrait d'obtenir des résultats d'identification semblables (voire identiques) à ceux obtenus par l'étude du génome entier.

2.2. Stratégie expérimentale

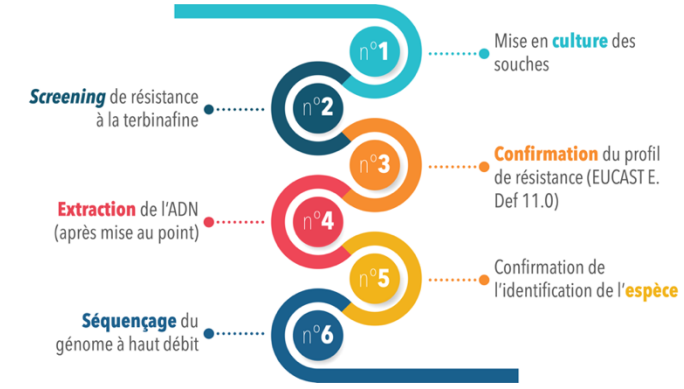


FIGURE 2.01. Schématisation des principales étapes du *wet-lab workflow*

Le wet-lab workflow est subdivisé en 6 étapes. Chacune de ces étapes est détaillée dans la partie matériel et méthodes de ce travail.

La stratégie expérimentale est divisée en 2 parties : une première partie dénommée « *wet-lab workflow* » qui regroupe toutes les manipulations qui ont été réalisées en amont du séquençage (**FIGURE 2.01**) et une seconde partie dénommée « *dry-lab workflow* », qui regroupe toutes les analyses bio-informatiques qui ont été réalisées (**FIGURE 2.02**). La première partie est elle-même subdivisée en 6 étapes. La première étape consiste à mettre en culture les dermatophytes étudiés sur milieu Sabouraud gentamicine chloramphénicol agar. Par la suite, les souches résistantes à la terbinafine sont identifiées grâce à un rapide *screening* sur plaque 12 puits. Les souches qui sont identifiées comme étant résistantes par cette méthode (et uniquement celles-ci) sont ensuite étudiées selon la procédure de référence EUCAST E.DEF 11.0 (*Arendrup et al., 2021*). Chacune des souches est ensuite mise en culture en milieu liquide afin de procéder à l'extraction et la purification de leur ADN. Après dosage de cet ADN, il est nécessaire de procéder à une confirmation de l'identification de l'espèce. A cette fin, le gène ITS2 est séquencé puis aligné au sein de la DB du WI grâce à l'algorithme BLAST (*Altschul et al., 1990*). Seules les souches identifiées comme appartenant au complexe *T. mentagrophytes /interdigitale/indotineae* sont retenues pour cette étude. L'ADN génomique subit ensuite un séquençage à haut-débit sur le système NovaSeq6000 commercialisé par la firme Californienne Illumina. Cette étape génère des fichiers fastq contenant à la fois les séquences ADN lues et leurs informations concernant la qualité de l'appel de base. Dès cet instant débute le *dry-lab workflow*, lui-même subdivisé en 6 étapes. La première étape du flux consiste à télécharger les fichiers fastq.gz situés sur le serveur de la plateforme GIGA Genomics et à réaliser un contrôle-qualité des données. Le génome de chaque souche est ensuite reconstitué grâce à un assemblage de novo, ce qui génère un fichier FASTA. Une analyse des marqueurs est ensuite réalisée grâce à WGST (*Hedera-22, 2020*). Enfin, plusieurs approches sont explorées afin de distinguer les espèces qui forment le complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. Parmi celles-ci figurent 2 approches basées sur l'étude du génome entier (classifications phylogénomiques) ainsi que 8 approches basées sur l'étude d'un seul gène (classifications phylogénétiques). Enfin, une analyse de performance permettra d'identifier, au sein des classifications phylogénétiques, l'approche qui permet de distinguer au mieux les espèces du complexe étudié.

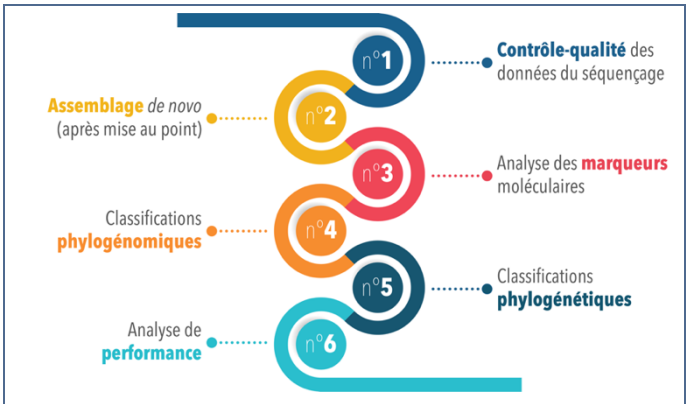


FIGURE 2.02. Schématisation des principales étapes du dry-*lab workflow*

Le dry-lab workflow est subdivisé en 6 étapes. Chacune de ces étapes est détaillée dans la partie matériel et méthodes de ce travail.

MATÉRIEL & MÉTHODES

PARTIE I

Matériel

3.1.1. **Dermatophytes** sélectionnés pour l'étude

Au total, 81 souches de dermatophytes ont été sélectionnées pour mener à bien cette étude (***FIGURE 3.01***). Leur origine est variée : tandis que certaines proviennent d'une précédente étude sur les teignes du cuir chevelu réalisée en 2018 (*Sacheli et al., 2020*), d'autres sont envoyées des 4 coins de la Belgique et sont, dans le cadre de l'activité journalière du CNRML, stockées en souchothèque pour une éventuelle utilisation ultérieure. Enfin, certaines de ces souches ont été reçues dans le cadre de l'étude de résistance à la terbinafine actuellement menée par le CNRML. Des souches de référence ont également été intégrées à l'étude, il s'agit de dermatophytes issus de la collection de Sciensano (BCCM/IHEM). Il s'agit des souches IHEM n°28378, n°28379, n°28380, n°28382, n°28384 et n°28388. Ces souches possèdent toutes un numéro de dossier GLIMS à 12 chiffres. Pour des raisons de facilité, chacune de ces souches s'est vu réattribuer un numéro partiel plus court.

Lien externe : **QR 01**

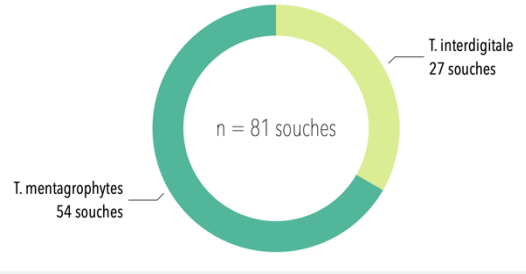


FIGURE 3.01. Répartition des souches sélectionnées

L'échantillon de départ est composé de 81 souches, dont 27 *T. interdigitale* et 54 *T. mentagrophytes*. A ce stade, la répartition est basée sur l'identification antérieurement obtenue au laboratoire de microbiologie du CHU de Liège. Cette identification sera confirmée ultérieurement par séquençage ITS.

3.1.2. **Matériel** de laboratoire et **appareillages**

Il a été décidé de diviser la section matériel et méthodes en 3 parties, la première d'entre elles étant une partie dédiée au référencement du matériel utilisé. Quel que soit le matériel considéré, une seule dénomination lui est attribuée. C'est cette dénomination qui sera utilisée tout au long des pages qui suivent.

TABLEAU 3A. Liste exhaustive du petit matériel de laboratoire utilisé

Dénomination	Utilisation	Référence / modèle
Multi-pipette	Préparation des plaques pour antifongigramme	RAININ Pipet-Lite Multi Pipette L8-200XLS+
Pipeteur automatique	Préparation des plaques de *screening*	DLab Levo Plus 7033110100
Pipette P2	Dosage de l'ADN au NanoDrop	RAININ Pipet-Lite LTS 0.1 – 2 µL
Pipette P10	Transfert sur gel d'électrophorèse	RAININ Pipet-Lite XLS 0.5 – 10 µL
Pipette P20	Usages multiples	RAININ Pipet-Lite XLS 20 - 200 µL
Pipette P100	Usages multiples	RAININ Pipet-Lite XLS 10 – 100 µL
Pipette P200	Usages multiples	RAININ Pipet-Lite XLS 20 - 200 µL
Pipette P1000	Usages multiples	RAININ Pipet-Lite XLS 100-1000 µL

TABLEAU 3B. Liste exhaustive des consommables de laboratoire utilisés

Dénomination	Utilisation	Référence / modèle
Écouvillon stérile	Usages multiples	Copan SOC-C0132020
Gel d'électrophorèse	Contrôle pré-séquençage de l'amplification ITS2	Thermo Scientific G501802
Plaque 12 puits	*Screening* du profil de résistance à la terbinafine	Thermo Scientific 130185
Pipette pasteur stérile	Usages multiples	Copan 201C901
Spatule d'inoculation stérile	Étalement du matériel sur la surface de la gélose	Sarstedt 86.1569.005
Tips 2 µL	Consommable de pipette	RAININ LTS BioClean Ultra 2 µL
Tips 200 µL	Consommable de pipette	RAININ LTS BioClean Ultra 200 µL
Tips 1000 µL	Consommable de pipette	RAININ LTS BioClean Ultra 1000 µL
Tubes à billes	*Bead beating* / extraction d'ADN (billes en verre 0.5 mm)	Omni INC, 19-622
Tubes en plastique	Préparation des suspensions 0.5 mcF	Sarstedt 55.476.005
Tubes en verre de 5 mL	Préparation d'une suspension fongique	Sarstedt 55.476.005
Tubes stériles de 50 mL	Culture des dermatophytes en milieu liquide	Falcon 352070

TABLEAU 3C. Liste exhaustive des milieux de culture prêts à l'emploi utilisés

Nom	Référence
Sabouraud chloramphénicol actidione agar en tubes inclinés	Biomérieux 42094
Sabouraud gentamicine chloramphénicol 2 agar en boîtes de Pétri	Biomérieux 43651

TABLEAU 3D. Liste exhaustive des appareillages utilisés

Dénomination	Utilisation	Référence / modèle
Agitateur chauffant	Agitation et chauffage	LaboModerne AG602
Appareil-photo à UV	Révélation des gels d'électrophorèse	Cole-Parmer WZ-97701-72
Autoclave	Autoclavage du matériel et des milieux	Tuttnauer 3850 EL
Bain marie	Choc thermique durant l'extraction d'ADN	STAR LAB N2400-4002
Balance	Mesure de diverses substances	Mettler PC 2200, DeltaRange
Broyeur cellulaire	Rupture mécanique des parois (*bead beating*)	IKA 0025000258
Centrifugeuse	Étapes de centrifugation (extraction d'ADN)	Eppendorf 5415
Congélateur à -80°C	Conservation des échantillons à long terme	Thermo Scientific Model 994
Densitomètre	Mesure de la densité optique	Biomérieux 21255
Hotte	Manipulation en conditions stériles	Esco 303110
Illumina NovaSeq 6000	Séquençage à haut-débit de l'ADN	Illumina NovaSeq 6000
Incubateur	Incubation des milieux inoculés	Memmert UNE 600
Lecteur de plaques	Lecture spectrophotométrique des plaques	Thermo Scientific 51119000
NanoDrop	Dosage de l'ADN par spectrophotométrie	Thermo Scientific ND-1000
Séquenceur Sanger	Séquençage post-amplification de l'ITS2	Thermo Scientific 4406016
Système à électrophorèse	Électrophorèse des gels	Thermo Fisher G8100
Système d'inoculation	Inoculation automatisée des plaques	Thermo Scientific V3020
Thermocycleur	Amplification du segment ITS2	Thermo Scientific 4375305

TABLEAU 3E. Liste exhaustive des réactifs utilisés

Nom	Référence
Agar	BD 214530
Azote liquide	/
Cell lysis solution (genomic purification)	Promega A7933
Chlorhydrate de terbinafine	Merck T8826
Diméthyle sulfoxide (DMSO)	Merck D4540
dNTP pour PCR [200 µM]	Promega U1511
Eau milli-Q	/
Eau pour préparation injectable	Braun BE119201
Marqueur de poids moléculaire *Quick-Load* 100bp	New England BioLabs N0467S
$MgCl_2$ pour PCR [3.5 mM]	Thermo Fisher N8080010
Sabouraud dextrose broth	Merck S3306
Tampon 1x pour PCR	Thermo Fisher N8080010

TABLEAU 3F. Liste exhaustive des kits d'extraction et de purification de l'ADN utilisés

Dénomination	Kit	Référence
DNEasy	QIAGEN™ **DNeasy**™ UltraClean Microbial	QIAGEN 12224-50
NucleoSpin	Macherey-Nagel™ **NucleoSpin**™ Blood QuickPure	Macherey-Nagel 740569.250

TABLEAU 3G. Liste des kits divers utilisés

Nom	Référence
CleanSEQ Dye-Terminator Removal Kit	Beckman A29151
KAPA SYBR FAST	Merck KK4618

TABLEAU 3H. Liste exhaustive des amorces utilisées

Nom	Concentration	Séquence	Référence
ITS4 + M13	0.5 µM	5'-CAG-GAA-ACA-GCT-ATG-ACC-**TCC-TCC-GCT-TAT-TGA-TAT-GC**-3'	*Ferrer et al., 2001*
ITS86 + M13	0.5 µM	5'-TGT-AAA-ACG-ACG-GCC-AGT-**GTG-AAT-CAT-CGA-ATC-TTT-GAA**-3'	*Ferrer et al., 2001*

TABLEAU 3I. Liste exhaustive des enzymes utilisées

Nom	Concentration	Référence
Taq polymérase	1.25 U	Thermo Fisher N8080155

3.1.3. Logiciels et matériel informatique

Pour des raisons pratiques, les analyses bio-informatiques ont dû être réalisées sur un système d'exploitation de type UNIX étant donné que la majorité des logiciels nécessaires ne sont disponibles que sur ce type de système d'exploitation (OS). Windows ne faisant pas partie de cette famille d'OS, il a d'office été exclu de la liste des candidats potentiels. Dans les faits, il est possible de mener à bien ces analyses sur Windows en passant à travers une machine virtuelle pour l'installation d'une variante de Linux. Depuis peu, une seconde solution s'offre aux utilisateurs grâce à *Windows Subsystem for Linux* (WSL), une couche de compatibilité permettant l'exécution de binaires initialement compilés pour Linux de manière native sur Windows 10/11. Néanmoins, des problèmes de performances se posent puisque l'utilisation des ressources matérielles disponibles reste limitée par ces solutions logicielles. La solution qui a été choisie est donc macOS, le système d'exploitation créé par *Apple Inc.* et ce, pour 2 raisons. La première raison de ce choix est logicielle puisqu'à l'inverse de Windows, macOS fait partie de la famille des OS dérivés d'UNIX. Il est donc capable d'exécuter la majorité des programmes bio-informatiques existants. La seconde raison est matérielle et liée à l'architecture des processeurs incorporés dans cette gamme d'ordinateurs depuis novembre 2020. Sans entrer dans les détails, cette architecture dénommée *RISC* est, dans les faits, beaucoup plus simpliste que celle de ses concurrents Intel et AMD, dénommée *CISC* mais permet, du fait de sa simplicité, d'itérer beaucoup plus rapidement sur le code d'un programme. La finalité est donc un gain de performance et un temps d'exécution réduit. Ceci ouvre la porte à la réalisation de certaines tâches gourmandes en ressources matérielles directement sur un ordinateur personnel (notamment l'assemblage d'un génome, autrefois possible uniquement sur un serveur distant). Sur cet ordinateur, plusieurs logiciels ont été installés (**TABLEAU 3J**). Tandis que certains possèdent une interface graphique, d'autres en sont dépourvus. Afin de faciliter la reproductibilité de la configuration de cet ordinateur, un protocole exhaustif est mis à disposition du lecteur dans la section méthodes de ce travail. Les outils/logiciels installés sont quant à eux listés dans cette section.

TABLEAU 3J. Liste exhaustive des logiciels, paquets et services utilisés

Nom	Version	Utilisation	Référence
4peaks	1.8	Visualisation des fichiers .ab1 (séquençage Sanger)	Griekspoor & Groothuis, 2004
Anaconda/Miniconda	4.11.0	Plateforme pour *data sciences* & gestion de paquets	Anaconda LTD, 2016
barrnap	0.9	Prédiction et extraction d'ARN ribosomique	Seeman, 2018
BLAST	2.10.1	Alignement d'une séquence ADN au sein d'un génome	Altschul et al., 1990
BWA	0.7.17	Alignement des *reads* contre génome de référence	Li & Durbin, 2009
cowplot	1.1.1	Extension ggplot2 : fusion de graphiques	Wilke, 2020
dplyr	1.0.7	Extension Rstudio : manipulation de *dataframes*	Wickham et al., 2021
FastANI	1.33	Calcul de l'ANI	Jain et al., 2018
Fastp	0.23.2	*Pre-processing* automatique des *reads*	Chen et al., 2018
FastQC	0.11.9	Contrôle qualité des *reads*	Andrews, 2010
G*Power	3.1.9.6	Analyse de la puissance statistique	Faul et al., 2007
ggplot2	3.3.5	Extension Rstudio : création de graphiques	Wickham, 2016
gridExtra	2.3	Extension ggplot2 : fusion de graphiques	Auguie, 2017
Homebrew	3.4.10	Gestionnaire de paquets sous macOS	Howell, 2009
iTOL	6.5.4	Visualisation et édition des dendrogrammes	Letunic & Bork, 2007
ITSx	1.1.3	Extraction de l'ITS à partir de l'ARNr	Bengtsson-Palme et al., 2013
Kraken2	2.1.1	Contrôle de contamination des *reads*	Wood & Salzberg, 2014
Krona pie chart	2.7	Visualisation des classifications Kraken2	Ondov et al., 2011
MAFFT	7.505	Alignement multiple de séquences ADN	Katoh, 2002
MEGAHIT	1.2.9	Assemblage *de novo* du génome	Li et al., 2015
moments	0.14	Extension Rstudio : investigation de la distribution	Komsta & Novomestky, 2015
MS Excel	16.59	Gestion de classeurs	Microsoft Corporation, 2022
MultiQC	1.12	Fusion de rapports FastQC	Ewels et al., 2016
Pilon	1.24	Correction automatique d'assemblages génomiques	Walker et al., 2014
PyCharm IDE	2021.3.2 (CE)	Environnement de développement intégré pour Python	JetBrains, 2017
QUAST	5.0.2	Évaluation de la qualité des assemblages	Gurevich et al., 2013
R	4.2.0	Langage de programmation statistique	R Core Team, 2021
raxmlGUI	2.0.7	Création de dendrogramme à partir d'un alignement	Edler et al., 2021
reshape2	1.4.4	Extension Rstudio : manipulation de *dataframes*	Wickham, 2007
rstatix	0.7.0	Extension Rstudio : calcul de paramètres statistiques	Kassambara, 2021
RStudio	2022.02.2+485	Environnement de développement intégré pour R	RStudio Team, 2021
samtools	1.15.1	Manipulation de données de séquençage à haut-débit	Li et al., 2009

TABLEAU 3J. Liste exhaustive des logiciels, paquets et services utilisés

Nom	Version	Utilisation	Référence
Seqotron	1.0.1	Visualisation et manipulation des fichiers .fasta	*Fourment & Holmes, 2016*
SPAdes	3.15.4	Assemblage *de novo* du génome	*Prjibelski et al., 2020*
tidyverse	1.3.1	Extension Rstudio : manipulation de données	*Wickham et al., 2019*
viridis	0.6.2	Extension Rstudio : palette colorimétrique	*Garnier et al., 2021*
WGS Typer	Non-spécifié	Assemblage *de novo* & typage moléculaire	*Hedera-22, 2020*

TABLEAU 3K. Liste exhaustive des génomes de référence utilisés

Genre & espèce	Souche	Assemblage	Référence NCBI
Microsporum audouinii	IHEM 2214	ASM2234408v1	GCA_022344085.1
Microsporum canis	CBS 113480	ASM15114v1	GCA_000151145.1
Nanizzia gypsea	CBS 118893	MS_CBS118893	GCA_000150975.2
Trichophyton benhamiae	CBS 112371	ASM15112v2	GCA_000151125.2
Trichophyton indotineae	TIMM 20114	ASM2306590v1	GCA_023065905.1
Trichophyton interdigitale	MR816	Tric_inte_MR816_V1	GCA_000622975.1
Trichophyton mentagrophytes	D15P127	ASM366446v1	GCA_003664465.1
Trichophyton rubrum	CBS 118892	ASM15142v1	GCA_000151425.1
Trichophyton soudanense	CBS 45261	Tric_soud_CBS_452_61_V1	GCA_000616865.1
Trichophyton tonsurans	CBS 112818	ASM15145v1	GCA_000151455.1
Trichophyton verrucosum	HKI 0517	ASM15150v1	GCA_000151505.1
Trichophyton violaceum	CMCC(F)T3I	CMCC(F)T3I	GCA_001651435.1

TABLEAU 3L. Liste exhaustive des séquences de référence utilisées

Séquence	Genre & espèce	Souche	Référence NCBI
ADN_r	*T. interdigitale*	CBS 428.63	JX122216
ADN_r	*T. mentagrophytes*	D15P127	MH708281.1
SQLE	*T. mentagrophytes*	/	BAL48859.1
TEF1a	*T. mentagrophytes*	CBS 102.68	KM678062.1

PARTIE II

Wet-lab workflow

3.2.1. Mise en **culture** des souches étudiées

Chacune des souches de dermatophytes étudiées est conservée, sous forme de tube, dans un milieu de conservation à -80°C dans la collection du CNRML. Chaque tube cryopréservé est récupéré puis laissé à température ambiante durant 30 minutes afin qu'il puisse se liquéfier. Les manipulations suivantes sont réalisées sous hotte afin d'éviter autant que possible les contaminations. Après homogénéisation du tube, une goutte de la suspension est prélevée à l'aide d'une pipette pasteur stérile. Cette goutte est transférée sur une gélose Sabouraud en boîte de Pétri, puis étalée sur toute la surface du milieu gélosé à l'aide d'une spatule d'inoculation stérile. La boîte inoculée est ensuite incubée à 30°C jusqu'à ce qu'une croissance soit visible. Le temps d'incubation est variable d'une espèce à l'autre, mais dans la majorité des cas, une croissance commence à apparaitre après 72 heures d'incubation. Dans un premier temps, seules des « tâches » translucides sont visibles à la surface du milieu gélosé : il s'agit en réalité du mycélium (***FIGURE 3.02 / A***). Lorsque la croissance arrive à un stade avancé, des spores apparaissent à la surface du milieu gélosé. Ces dernières ont un aspect blanchâtre qui, selon les espèces, peut être granuleux (***FIGURE 3.02 / B***) ou plutôt duveteux (***FIGURE 3.02 / C***). L'aspect des spores est un indicateur important pour établir s'il y'a présence ou non d'une contamination. Les dermatophytes ont, en règle générale, des spores d'aspect blanchâtre. Si ces dernières apparaissent plutôt verdâtres, le milieu est considéré comme étant contaminé et la souche est à nouveau mise en culture en précédant comme détaillé précédemment. En pratique, les milieux gélosés en boîtes de Pétri ont tendance à se déshydrater assez rapidement, ce qui nécessite de procéder à une nouvelle inoculation à chaque fois qu'une manipulation sur le dermatophyte étudié est nécessaire. Pour contourner ce problème, des milieux gélosés en tubes ont été inoculés à partir des milieux gélosés en boîtes de Pétri. Ceux-ci peuvent se conserver beaucoup plus longtemps à température ambiante sans se déshydrater (***FIGURE 3.03***).

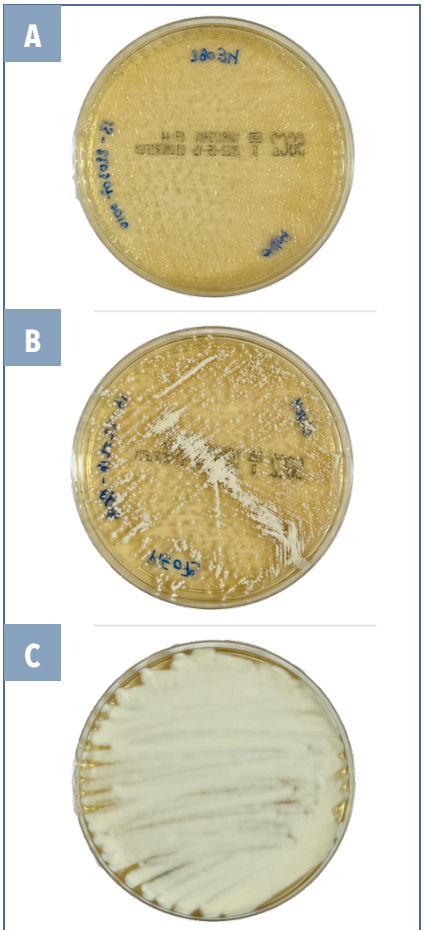


FIGURE 3.02. Géloses Sabouraud inoculées

Lors de l'incubation, le mycélium apparaît en premier. Il est suivi de l'apparition des spores, souvent blanchâtres en ce qui concerne les dermatophytes. Les spores qui ne répondent pas à ce critère ont servi d'indicateur de contamination.

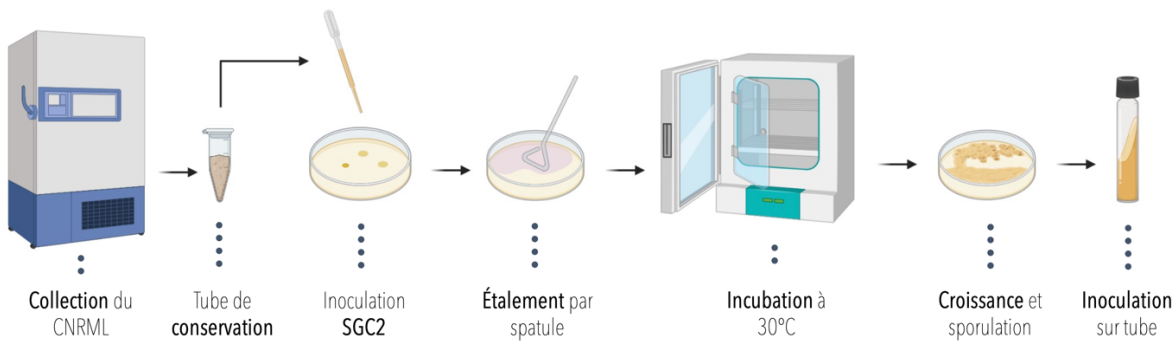


FIGURE 3.03. Flux de travail pour l'inoculation des souches de dermatophytes étudiées

Les tubes de conservation sont récupérés dans la collection du CNRML, puis un petit volume est transféré sur un milieu Sabouraud gentamicine chloramphénicol (SGC2). Ce volume est étalé pour recouvrir toute la surface de la boîte et celle-ci est incubée à 30°C. Après quelques jours, la souche donne lieu à une croissance et une sporulation. Un milieu de culture en tube est ensuite inoculé en partant de la boîte précédemment incubée.

3.2.2. *Screening* du profil de résistance à la terbinafine

Pour identifier les souches résistantes à la terbinafine, 2 méthodes sont utilisées. En premier lieu, une méthode de dilution sur gélose sur plaques 12 puits permet un *screening* rapide de la population de dermatophytes étudiée. Pour cela, une suspension à 0,5 McFarland du dermatophyte étudié est préparée, puis 25µL de cette suspension sont transférés dans chacun des 4 puits d'une ligne sur la plaque. Chaque puit contient en réalité un milieu de culture Sabouraud-agar (30 g/L de Sabouraud et 15 g/L d'agar) préalablement supplémenté avec une concentration définie de chlorhydrate de terbinafine (***FIGURE 3.04***). Un contrôle de croissance est également présent, sans terbinafine. Depuis le 18 janvier 2022, le référentiel de l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) préconise de considérer un *break point* de 0,125 µg/mL en ce qui concerne la terbinafine. Cette valeur est néanmoins dépendante des espèces. Ainsi, elle est effectivement fixée à 0,125 µg/mL pour les dermatophytes de l'espèce *T. interdigitale/mentagrophytes/indotineae* qui concerne cette étude, mais vaut 0,03 µg/mL pour ceux de l'espèce *T. rubrum*. Une souche capable de croitre à une telle concentration est ainsi définie comme étant résistante à la terbinafine. En ce qui concerne les plaques de *screening*, le *break point* est situé entre le 3ème et le dernier puit. Une souche sera donc considérée comme étant résistante si le contrôle de croissance est positif et si la croissance se poursuit au sein des puits 3 et 4. A l'inverse, une souche sera considérée comme sensible si la croissance ne s'étend pas au-delà du deuxième puits. Un résultat est invalidé si le contrôle de croissance est négatif. La sensibilité ainsi que la spécificité de cette configuration de plaque ont été évaluées lors d'une étude récemment menée par le CNRML. Les résultats expérimentaux ont fait état d'une sensibilité de 100% après une incubation de 96 heures à 30°C. La spécificité n'est quant à elle que de 85%, ce qui conduit inévitablement à l'émergence de faux positifs (*Gouters, 2021*). Dans le cadre d'un *screening*, ceci est toléré dans la mesure où les souches détectées comme étant résistantes avec cette méthode sont systématiquement testées selon la procédure EUCAST E. Def 11.0 (*Arendrup et al., 2021*). Plus laborieuse, cette dernière permet néanmoins de compenser le manque de spécificité de la méthode de *screening*.

Lien externe : QR 02
protocols.io

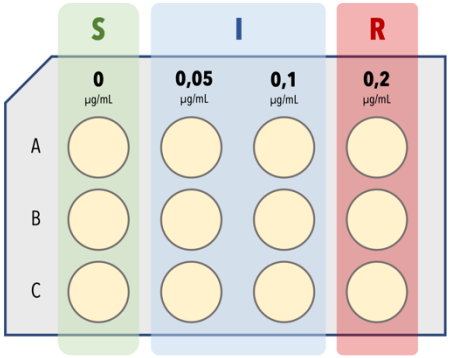


FIGURE 3.04. Configuration de la plaque pour la méthode de dilution

La plaque est constituée de 12 puits organisés en 3 lignes de 4 puits chacune. Une plaque permet l'étude de 3 souches de dermatophytes (1 souche par ligne). Le premier puit est un contrôle de croissance qui, par définition, ne contient pas de chlorhydrate de terbinafine. Les 3 puits suivants sont supplémentés en chlorhydrate de terbinafine à des concentrations respectives de 0.05, 0.1 et 0.2 µg/mL.

3.2.3. Antifongigramme EUCAST E.Def. 11.0

Cet antifongigramme est réalisé sur des plaques 96 puits organisée en 8 lignes et 12 colonnes (***FIGURE 3.05***). A l'exception du contrôle de croissance, chacun de ces puits contient un milieu RPMI supplémenté avec une quantité définie d'un des 4 antifongiques étudiés : la terbinafine, l'itraconazole, le voriconazole et l'amorolfine. Pour mener à bien cet examen, une suspension aqueuse du dermatophyte étudié est préparée. La concentration de cette dernière est fixée en utilisant la densité optique. La valeur retenue est de 0.5 McFarland. Pour les dermatophytes qui sporulent, la méthode est facilement applicable. Il existe néanmoins certaines complications pour les souches qui ne sporulent pas (ou peu), qu'il est possible de contourner en réalisant une culture sur des milieux alternatifs (typiquement, le milieu Takashio est dédié à cet effet). Un volume de cette suspension est ensuite disposé dans un tube d'inoculation qui contient de l'eau déminéralisée stérile, auquel sont ajoutés du cycloheximide et du chloramphénicol pour diminuer le risque de contamination. Une tête d'inoculation est placée sur ce tube, puis les plaques sont inoculées par un automate pour assurer une reproductibilité optimale.

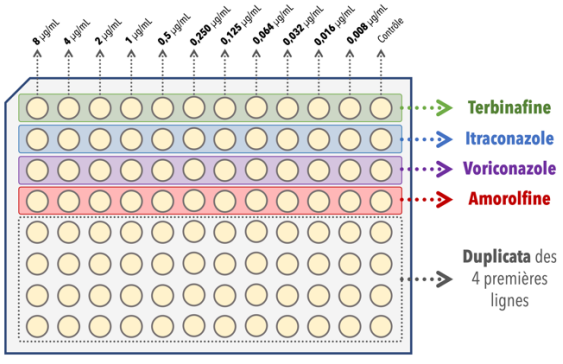


FIGURE 3.05. Configuration de la plaque pour la méthode de microdilution

La plaque est constituée de 96 puits organisés en 8 lignes de 12 puits chacune. Une plaque permet l'étude d'une seule souche de dermatophyte. Chaque ligne étudie la sensibilité de cette souche à un seul antifongique. En partant du bord droit de la plaque, le premier puit correspond à un contrôle de croissance. Les 11 puits suivants contiennent une concentration croissante de l'antifongique étudié, allant de 0,008 µg/mL jusqu'à 8 µg/mL. La première ligne étudie la sensibilité à la terbinafine, la seconde à l'itraconazole, la troisième au voriconazole et la dernière à l'amorolfine. Cette disposition est répétée pour les 4 lignes suivantes afin de gagner en précision.

Les plaques sont ensuite incubées à température ambiante durant 7 jours. La lecture se fait par spectrophotométrie. L'analyse des résultats ainsi que l'interprétation sont détaillées dans la section *dry-lab workflow* de ce travail.



3.2.4. Mise au point de l'**extraction** de l'ADN

Chaque souche de dermatophyte est cultivée dans 25 mL de milieu Sabouraud liquide à 30° C durant 96 heures. Le culot de cette suspension fongique est extrait à la pipette pasteur et transféré dans un tube stérile dénommé « tube primaire » ci-après. La paroi des dermatophytes étant difficile à rompre, il convient de combiner choc thermique, lyse mécanique, lyse chimique et lyse enzymatique afin de permettre la libération de l'ADN dans le milieu extracellulaire. La méthode par laquelle ces lyses sont obtenues diffère selon le kit utilisé pour l'extraction.

3.2.4.1. Kit Macherey-Nagel **NucleoSpin™** Blood QuickPure

Pour des raisons de facilité, ce kit sera dénommé « kit NucleoSpin » dans la suite de ce travail. Pour l'extraction de l'ADN à partir de dermatophytes, des étapes de lyse préliminaires sont nécessaires. Pour ce faire, un tube primaire est préparé tel qu'indiqué ci-dessus. Il faut veiller à utiliser un tube contenant des billes en verre adapté au *bead beating*. Un tampon de lyse est ajouté à ce tube, ce qui permet une lyse chimique. Ce tube primaire est ensuite refroidi à -20°C, puis directement réchauffé à 70°C dans un laps de temps très court, ce qui crée une lyse par choc thermique. Finalement, ce tube est passé au broyeur cellulaire afin de permettre une lyse mécanique par *bead-beating*. Ceci constitue un cycle à 3 étapes qui sera répété 5 fois afin de maximiser le phénomène de lyse de la paroi. Le lysat ainsi obtenu constitue le lysat primaire, auquel seront ajoutés un nouveau tampon de lyse ainsi qu'une protéinase K. Le mélange est incubé à la température de fonctionnement optimal de l'enzyme. Les protéines et autres impuretés sont précipitées grâce à l'ajout d'éthanol absolu, suivie d'une courte centrifugation. Le surnageant est ensuite extrait du tube et transféré dans une colonne chromatographique permettant la purification de l'ADN. La colonne est chargée par centrifugation et le *flows-through* est éliminé. Un tampon de lavage est ajouté à la colonne afin de permettre l'élimination des impuretés et ainsi purifier l'ADN. La colonne est à nouveau centrifugée et le *flow-trough* éliminé. Enfin, l'ajout du tampon d'élution dans la colonne suivie d'une centrifugation permet la récupération de l'ADN purifié dans un tube stérile.



3.2.4.2. Kit Qiagen **DNEasy™** UltraClean Microbial

Pour des raisons de facilité, ce kit sera dénommé « kit DNEasy » dans la suite de ce travail. Pour l'extraction de l'ADN à partir de dermatophytes, des étapes de lyse préliminaires sont nécessaires. Pour ce faire, un tube primaire est préparé tel qu'indiqué précédemment. Il est nécessaire de veiller à utiliser les tubes PowerBead fournis dans le kit d'extraction. La solution PowerBead est ajoutée à ce tube en combinaison de la solution SL, toutes deux fournies dans le kit d'extraction. Cette combinaison permet de créer à la fois la lyse chimique mais aussi la lyse enzymatique. Ce tube est ensuite plongé dans l'azote liquide à -196°C, puis réchauffé à 56°C dans un laps de temps très court, ce qui crée une lyse par choc thermique. Finalement, ce tube est passé au broyeur cellulaire afin de permettre une lyse mécanique par bead-beating. Ceci constitue un cycle à 3 étapes qui sera répété 3 fois afin de maximiser le phénomène de lyse de la paroi. Le lysat ainsi obtenu constitue le lysat primaire. Ce dernier est centrifugé pour séparer l'ADN des débris cellulaires, puis le surnageant est transféré dans un tube de collecte propre (fourni dans le kit d'extraction). La solution IRS (fournie dans le kit d'extraction) est ajoutée à ce surnageant avant que ce dernier ne subisse une nouvelle centrifugation. Le surnageant résultant de cette étape est transféré dans un nouveau tube de collecte et la solution SB y est ajoutée (fournie dans le kit d'extraction). Cette suspension est ensuite chargée dans la colonne chromatographique fournie avant que cette dernière ne subisse une centrifugation. Le *flow-through* est éliminé et l'ADN est à présent chargé dans la colonne. Les étapes qui suivent permettent sa purification. Pour cela, la solution CB est ajoutée à la colonne et cette dernière est centrifugée. Pour l'élution de l'ADN, la solution EB est ajoutée à la colonne puis cette dernière est centrifugée. Le *flow-through* est récupéré dans un tube de collecte propre et constitue l'ADN extrait et purifié.



3.2.4.3. Comparaison du **rendement** d'extraction

Lien externe : **QR 06**

Afin de permettre la comparaison des rendements d'extraction des 2 kits utilisés, 20 souches de dermatophytes ont été sélectionnés aléatoirement parmi les 81 souches disponibles. Étant donné qu'il existe une liste exhaustive de toutes les souches qui composent la population de départ (n = 81 souches), cette sélection aléatoire est basée sur un modèle probabiliste. Ainsi, chaque dermatophyte possède une probabilité de 1,639% d'intégrer la sélection. Cette probabilité est telle que $P = \frac{1}{y-x}$ où y représente le nombre total de souches (ici, y vaut 81) et x le nombre de souches ayant été écartées (ici, x vaut 20). Pour mettre en œuvre cette fonction de sélection aléatoire, le langage de programmation Python s'avère être une solution adéquate. La manière la plus simple d'arriver à cette fin est d'utiliser la classe random.sample(). Cependant, celle-ci est basée sur l'algorithme de Mersenne-Twister, la sélection n'est donc pas réellement aléatoire mais plutôt à caractère pseudo-aléatoire. Pour pallier cela, il existe une classe Python, random.SystemRandom(), qui utilise les ressources matérielles à travers le système d'exploitation pour mesurer un ou plusieurs paramètres physiques (la position du curseur de la souris à l'instant t, entre autres) et ainsi générer, sur base de ce paramètre, une sélection réellement aléatoire qui est, de ce fait, non-reproductible. L'ADN des 20 souches de dermatophytes sélectionnées est alors extrait 2 fois : une première fois en utilisant le kit NucleoSpin et une seconde fois en utilisant le kit DNEasy. En pratique, il est très fastidieux d'effectuer les 2 extractions le même jour, ces dernières sont donc réparties sur 2 jours successifs. Ceci donne lieu inévitablement à un biais dû à une incubation plus longue pour les souches qui sont traitées le second jour de l'extraction. Pour supprimer ce biais, un calendrier d'inoculation a été établi (***FIGURE 3.07***). Ainsi, les souches sont incubées 96h et ce, peu importe si elles sont traitées le premier ou le second jour de l'extraction. Après extraction, l'ADN est quantifié par spectrophotométrie à 260nm et les résultats sont encodés dans une DB qui servira ultérieurement à l'analyse statistique. Cette DB comprend le numéro de la souche, la concentration de l'ADN (en ng/µL), le ratio A_{260}/A_{280} ainsi que le ratio A_{260}/A_{230}.

Lien externe : **QR 07**

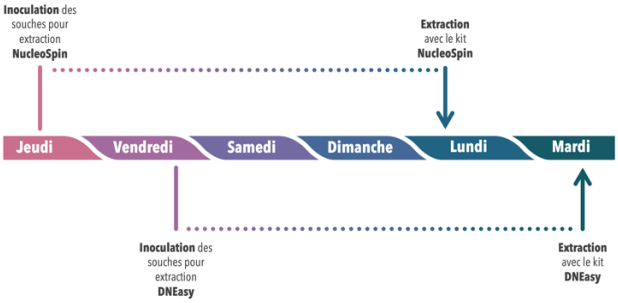


FIGURE 3.06. Calendrier d'inoculation des souches de dermatophytes

Les souches destinées à être traitées le lundi sont inoculées à J-4, soit le jeudi qui précède. De la même façon, les souches destinées à être traitées le mardi sont inoculées à J-4, soit le vendredi qui précède. Ainsi, les souches sont toujours incubées 96h et un éventuel biais dû à un temps d'incubation plus long peut être écarté.

3.2.5. **Caractérisation** par séquençage du segment **ITS2**

Les souches de dermatophytes sélectionnées pour l'étude ont subi par le passé une identification. Cependant, comme mentionné dans l'introduction de ce travail, le recourt au séquençage de la région ITS2 n'a lieu qu'en cas de doute lié à l'identification et/ou en présence d'éléments contradictoires nécessitant l'apport de nouvelles informations au tableau clinique. Par conséquent, il a été décidé de procéder à un séquençage du segment ITS2 pour tous les dermatophytes de l'étude afin, d'une part, de s'assurer que seules les espèces *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* sont traitées et, d'autre part, de s'assurer que l'identification obtenue par séquençage à haut-débit est identique à celle qui aura été, au préalable, obtenue par séquençage Sanger.

3.2.5.1. Amplification du segment ITS2

Avant de procéder à son séquençage, la région ITS2 est amplifiée par PCR. Pour cela, les amorces ITS4 et ITS86 sont utilisées en combinaison des amorces de séquençage M13 (***TABLEAU 3H***). Il est recommandé d'intégrer dans les calculs de dilution un correcteur de pertes de volumes dû au pipetage. Un mix PCR est préparé en combinant le tampon de l'enzyme, le $MgCl_2$, les dNTP et les amorces et l'enzyme (***TABLEAU 3M***). Onze tubes à PCR sont préparés afin d'y transférer 45 µL du *-mix*. Cinq µL de l'ADN génomique extrait précédemment sont transférés dans l'un des 9 tubes dédiés aux échantillons, pour un volume total de 50 µL par tube (ADN + *master-mix*). Comme dit précédemment, 2 tubes sur les 12 préparés servent aux contrôles. Pour le premier tube de la série, il s'agit d'un contrôle négatif, les 5 µL d'ADN sont dès lors remplacés par 5 µL d'un contrôle négatif d'extraction.

TABLEAU 3M. *Mix (1 éch.)*

Réactif	Volume (µL)
Tampon [1x]	5
$MgCl_2$ [3,5 mM]	7
dNTP [200 µM]	0,4
ITS4 [0,5 µM]	0,5
ITS86 [0,5 µM]	0,5
H_20	26,35
Taq [1,25 U]	0,25

Le dernier tube de la série est quant à lui un contrôle positif, les 5 µL d'ADN sont remplacés par 5 µL d'un contrôle positif (ADN d'une souche de référence caractérisée au préalable). L'amplification est ensuite lancée (***FIGURE 3.07***) en s'assurant qu'aucune bulle n'est présente dans le tube. Si c'est le cas, il convient de procéder à une courte centrifugation. Lorsque le cycle est clôturé, les amplicons sont récupérés afin de poursuivre avec une révélation par électrophorèse sur gel d'agarose.

3.2.5.2. Électrophorèse sur gel d'agarose

L'électrophorèse est réalisée sur des gels prêts à l'emploi, ce qui permet d'une part un gain de temps conséquent et d'autre part, une reproductibilité optimale. Il s'agit de gels dont la concentration en agarose est de 2%. Ils contiennent chacun 12 puits et permettent donc l'analyse de 9 échantillons (le premier puit servant au marqueur de poids moléculaire, le second au contrôle négatif et le dernier au contrôle positif). Les gels sont préalablement colorés au bromure d'éthidium, il convient dès lors de les manipuler avec un maximum de précautions. La première étape consiste à insérer le gel dans le système pour électrophorèse et à lancer un programme « *pre-run* ». L'opérateur peut ensuite disposer 10 µL d'eau et 10 µL de produit PCR dans chaque puit, excepté pour le premier puit qui contiendra 10 µL d'eau et 10 µL de marqueur de poids moléculaire (***FIGURE 3.08***). Lorsque le gel est chargé, le programme adéquat (e-Gel 2%) peut être lancé pour démarrer la migration des échantillons. Ce programme dure une dizaine de minutes. Lorsqu'il se termine, l'observation du gel peut se faire sous lumière UV à 254 nm, soit sur le trans-illuminateur pour apprécier un premier résultat, soit sur un système équipé d'une caméra pour pouvoir garder une trace du résultat.

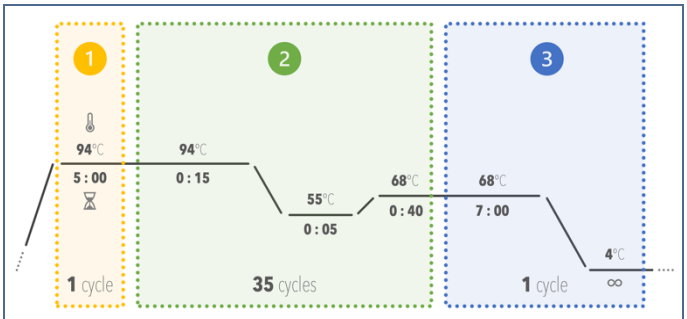


FIGURE 3.07. Paramètres utilisés pour l'amplification de la région ITS2

Après une de dénaturation initiale de 5 minutes à 94°C, 35 cycles d'amplification eux-mêmes subdivisés en 3 étapes sont réalisés. La première étape est une dénaturation de l'ADN (15 secondes à 94°C), la seconde est une étape d'hybridation des amorces (5 secondes à 55°C) et la dernière est une étape d'élongation des brins (40 secondes à 68°C).

3.2.5.3. Séquençage du segment ITS2 selon la méthode Sanger

En pratique, ce séquençage à faible-débit est pris en charge par le SCBM. Les amplicons résultant de l'étape d'amplification sont simplement transférés au sein d'une plaque 96 puits, mise à disposition par le SCBM. Après séquençage, un fichier à extension .ab1 est généré. Ce fichier contient à la fois la séquence d'intérêt et les informations liées à la qualité des bases qui composent cette séquence.

3.2.6. Séquençage à haut débit du génome

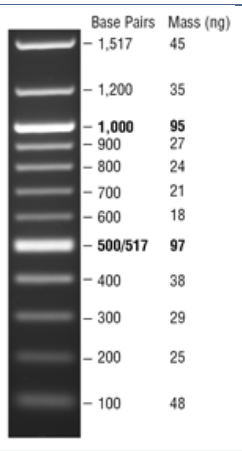


FIGURE 3.08. Marqueur N0467S

Dans la situation où il y'a effectivement eu amplification du fragment ITS2, une bande doit être observée entre 250 et 350 paires de bases.

SOURCE : New England BioLabs, 2022

Comme spécifié plus haut, cet ADN est quantifié par spectrophotométrie afin de déterminer, pour chaque souche, 3 paramètres : la concentration de l'ADN (en ng/µL), le ratio A_{260}/A_{280} ainsi que le ratio A_{260}/A_{230}. En vue du séquençage, la concentration minimale d'ADN requise est de 1 ng / µL. Pour ce qui est des 2 derniers paramètres, ils permettent l'appréciation de la pureté de l'ADN extrait. Ce dernier est ensuite envoyé à la plateforme *GIGA Genomics* afin qu'il puisse être séquencé. En pratique, bien qu'il ait subit plusieurs cycles de purification, des résidus protéiques et/ou d'ARN demeurent présents dans le tube contenant l'ADN d'intérêt. Ces contaminants ont une absorbance qui leur est propre, ce qui mène à un biais de surestimation de la concentration de l'ADN. Il existe des kits qui, à l'inverse, ne sont pas basés sur une mesure spectrophotométrique. Ceux-ci permettent d'isoler l'absorbance de l'ADN, fournissant ainsi une estimation beaucoup plus précise de la quantité d'ADN présente. Dans ce cas-ci, le kit utilisé à cette fin par la plateforme *GIGA Genomics* est basé sur une PCR quantitative : il s'agit du kit KAPA SYBR FAST commercialisé par Roche (***TABLEAU 3G***). Lorsque les librairies sont quantifiées, elles sont séquencées à haut-débit sur Illumina NovaSeq6000. Après démultiplexage, 2 fichiers sont générés : l'un contenant les *reads* R1 et l'autre contenant les *reads* R2. Ces fichiers sont ensuite transmis au CNRML et serviront de base pour les analyses bio-informatiques.

PARTIE III

Dry-lab workflow

3.3.1. Configuration de l'**environnement** de travail

Le séquençage du génome génère 2 fichiers fastq : l'un pour le sens forward (R1) et l'autre pour le sens reverse (R2). Il s'agit donc d'un séquençage dit en « *pair end* ». L'analyse de ces fichiers requiert de nombreux outils informatiques et il est recommandé de s'assurer que ces outils sont installés et prêts à l'emploi avant de lancer la manipulation des fichiers pour éviter une profusion de messages d'erreurs. La liste exhaustive des logiciels à installer figure dans le ***TABLEAU 3J***, et un protocole complet permettant la configuration de l'environnement de travail est accessible grâce au lien ci-contre.

Lien externe : **QR 08**

protocols.io

3.3.2. **Analyse** des données de l'**antifongigramme**

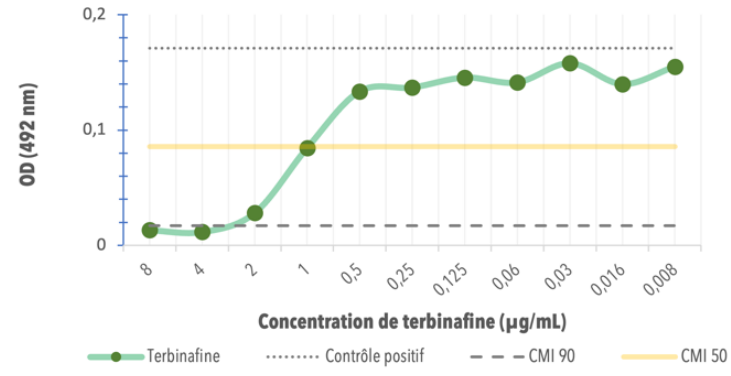


FIGURE 3.09. Évolution de l'absorbance pour la terbinafine

Le graphique est basé sur les absorbances corrigées lues à 492 nm. La courbe verte désigne l'évolution de l'absorbance du puit en fonction de la concentration en terbinafine. Trois autres repères figurent sur le graphique : la ligne grise en traits fins correspond au cut-off de CMI_{90}, la ligne jaune correspond au cut-off de CMI_{50} et, enfin, la ligne en pointillés fins correspond à l'absorbance du contrôle de croissance.

La lecture spectrophotométrique (à 492 nm) de l'absorbance de chacun des 96 puits de la plaque génère une table dénommée « absorbance brute ». Il est nécessaire de transformer ces valeurs afin d'aboutir à un résultat interprétable. La première étape consiste à soustraire l'absorbance intrinsèque du milieu (RPMI + chloramphénicol + cycloheximide) à chaque puit. Pour cela, un blanc analytique a été établi en amont de l'analyse, la valeur moyenne qui lui est attribuée est de 0,0838. La nouvelle table obtenue est dénommée « absorbance corrigée ». La seconde étape consiste à déterminer les valeurs *cut-off* (CMI_{50} et CMI_{90}). Ces dernières correspondent respectivement à 50% et 10% de l'absorbance corrigée du contrôle de croissance. Un graphique en nuages de points est ensuite construit sur base des absorbances corrigées. Le graphique est lu de la droite vers la gauche, et la CMI_{50} correspond à la plus petite concentration de l'antifongique capable de faire chuter l'absorbance du puit (et donc, indirectement, la croissance du dermatophyte) de moitié. Visuellement, ceci se traduit par le 1er point situé en dessous de la ligne jaune (qui correspond à la CMI_{50}). En l'occurrence, pour le cas illustré par la ***FIGURE 3.10***, la CMI_{50} pour la terbinafine vaut 2 µg/mL. La concentration de terbinafine nécessaire pour inhiber de moitié la croissance du dermatophyte est donc supérieure à celle du *breakpoint* préconisé par l'EUCAST (***TABLEAU 3N***). Par conséquent, la souche étudiée est considérée comme étant résistante à la terbinafine. Cette méthodologie est réitérée pour chacune des 8 lignes d'une plaque, générant ainsi 8 graphiques (un par ligne). Pour faciliter l'analyse des données, un classeur automatisé a été créé. Ce dernier est téléchargeable grâce au lien ci-contre.

TABLEAU 3N. *Breakpoints* utilisés pour les espèces *T. mentagrophytes / interdigitale / indotineae*

Antifongique	*Breakpoint*
Terbinafine	0,125 µg/mL
Itraconazole	0,25 µg/mL
Voriconazole	1 µg/mL
Amorolfine	0,5 µg/mL

SOURCE : The EUCAST, 2022

Lien externe : **QR 09**

3.3.3. **Analyse** de la séquence du segment **ITS2**

Lien externe : **QR 10**

WESTERDIJK INSTITUTE

Lorsque le SCBM clôture le séquençage demandé, un fichier .ab1 est généré et transféré sur un serveur commun. Ce fichier est ouvert grâce au logiciel 4Peaks. Un filtre de qualité est appliqué afin de ne conserver que la région de la séquence dont le score de qualité est supérieur ou égal à 20 (ce qui correspond à une précision de 99%). La séquence filtrée est ensuite récupérée pour être alignée au sein de la DB du WI. Cette DB est accessible grâce au lien ci-contre.

L'identification obtenue est considérée valide si la DB identifie 3 fois la même espèce avec un score de similarité supérieur ou égal à 95%. Cette méthode, bien que très utilisée en routine, ne permet pas de discriminer les espèces phylogénétiquement proches. Sa mise en place à ce stade permet néanmoins de s'assurer que les souches étudiées appartiennent effectivement au complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*, sans nécessairement tenir compte de l'identification exacte de l'espèce.

3.3.4. Contrôle des données du NGS

Lorsque l'environnement de travail est configuré, la première étape consiste à transférer les données de séquençage depuis le serveur de la plateforme *GIGA Genomics* vers le disque dur de l'ordinateur qui servira aux analyses. Pour faciliter ce transfert, les fichiers fastq sont compressés à l'aide de l'utilitaire gzip (*Deutsch, 1996*), ce qui réduit considérablement leur taille.

3.3.4.1. Contrôle de l'intégrité des données (hash md5)

Lien externe : QR 11

GitHub

Lorsque le transfert est terminé, il est fortement recommandé de vérifier l'intégrité des fichiers afin de s'assurer qu'aucune donnée n'a été corrompue durant le téléchargement. A cette fin, la plateforme *GIGA Genomics* génère au préalable un fichier texte contenant une empreinte numérique pour chacun des fichiers fastq.gz présents sur le serveur. Cette empreinte est le résultat de la fonction de hachage cryptographique MD5 (*Rivest, 1992*). Il suffit dès lors de recréer une empreinte numérique en appliquant la même fonction de hachage et ce, à chacun des fichiers fastq.gz téléchargés. Le principe est le suivant : si cette empreinte est identique à celle qui a été générée par la plateforme *GIGA Genomics*, l'intégrité des données est vérifiée. Dans le cas contraire, le transfert a donné lieu à une corruption des données. Dans le but de faciliter cette vérification, un script Python a été écrit (voir code source ci-contre). Ce dernier compare les 2 empreintes numériques caractère par caractère et alerte l'utilisateur s'il y'a une discordance entre elles. Ce dernier peut soit être exécuté dans l'IDE PyCharm préalablement installé, soit être exécuté directement dans le terminal grâce à la commande *python3* suivie du chemin d'accès menant au script.

3.3.4.2. Contrôle de la qualité des données

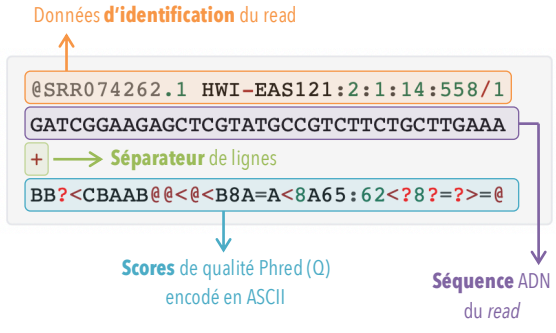


FIGURE 3.10. Structure du format fastq

Le fichier est organisé en reads, chaque read occupant 4 lignes dans le fichier. La première ligne contient les informations d'identification du séquençage. La seconde ligne indique les bases formant la séquence du read. La troisième ligne contient uniquement le symbole « + », dont le rôle est de délimiter les lignes 2 et 4. Enfin, la ligne 4 contient, pour chacune des bases, un score de qualité Phred encodé sous forme de symbole ASCII. Ce symbole est ensuite converti en décimale en se référant à une table de conversion pour obtenir un nombre qui, dans le cas de la version 1.8 de l'encodage propre aux séquenceurs Illumina, s'étend de 33 à 73. Il faut donc retirer 33 à la valeur décimale obtenue pour, *in fine*, obtenir la valeur finale du score de qualité Phred. A titre d'illustration, la première base du read ci-dessus est une guanine dont le score de qualité est noté à l'aide du symbole B. En décimal, ce symbole a la valeur 66 dans la table de conversion. Pour obtenir le score Q, il suffit dès lors de soustraire 33 à 66, ce qui résulte en un score égal à 33. En conclusion, pour cette première base, la probabilité que l'appel soit incorrect (P) est égale à $5{,}01 \times 10^{-4}$, ce qui indique une précision de 99,95% soit un taux d'erreur d'une base sur un total de 2000 bases. Ce raisonnement est appliqué pour chacune des bases qui constituent le read et permet de contrôler la qualité des données avant d'effectuer un quelconque alignement de séquences, très couteux en termes de ressources et de temps.

Le séquençage à haut débit peut générer des dizaines de millions de séquences en un seul run. Lorsque l'analyse est terminée, le séquenceur génère un fichier dont l'extension est .fastq. Ce fichier contient les données brutes du séquençage, combinant à la fois les séquences ADN (appelés *reads*) ainsi que les scores de qualité pour chaque base et ce, pour chaque cycle. Il est ainsi constitué de la répétition d'un motif à 4 lignes (**FIGURE 3.10**). Lors du séquençage, la détermination de la nature de la base insérée est possible grâce à la lecture de la fluorescence émise. La lecture est faite via plusieurs micro-caméras situées au-dessus de la *flow-cell*. Un graphe est ainsi construit avec 4 courbes correspondant aux 4 couleurs fluorescentes possibles. Le graphe idéal serait constitué de pics uniformément espacés et qui ne se chevauchent pas. Cependant, la réalité est toute autre étant donné les imperfections du système de détection des émissions fluorescentes (*Ewing et al., 1998*). Pour déterminer la probabilité qu'une base donnée ait été mal lue (P), l'ordinateur se base sur le graphe obtenu afin de déterminer plusieurs paramètres : les espaces entre deux pics consécutifs, la hauteur des pics ou encore la distance entre la base actuelle et la base non-identifiée la plus proche. Sur base de ces paramètres, l'ordinateur est capable de fixer un score de qualité Phred (**FIGURE 3.11**). Dès lors, il convient d'investiguer la qualité des données avant de procéder à l'assemblage du génome, d'autant plus que les outils dédiés à cette tâche sont très peu gourmands en ressources matérielles. Parmi ces derniers, FastQC (*Andrews, 2010*) est la solution de choix. Il permet d'analyser un fichier fastq.gz et de générer, sur base de celui-ci, un rapport sous format HTML. Ce rapport peut soit être ouvert individuellement soit servir de base à un autre utilitaire : MultiQC (*Ewels et al., 2016*). Là où FastQC génère un rapport par fichier analysé, MultiQC permet de résumer une multitude de rapports en un seul fichier HTML. Ceci permet d'avoir une vue globale quant à la qualité du séquençage tout en réduisant drastiquement le temps nécessaire à cette étape.

Score Q	Probabilité d'erreur P	Précision
0	1 base pour 1	0%
10	1 base pour 10	90%
20	1 base pour 100	99%
30	1 base pour 1000	99,9%
40	1 base pour 10 000	99,99%

FIGURE 3.11. Signification du score de qualité Phred (Q)

Ce score est obtenu en appliquant la formule $Q = -10log_{10}P$ où Q représente le score de qualité Phred et P représente la probabilité que la base insérée dans le read soit incorrecte. Ce score est inversement proportionnel à la probabilité qu'un appel de base soit incorrect durant le séquençage. Par conséquent, la précision augmente avec Q. En pratique, on considère qu'un appel de base est correct si son score est supérieur ou égal à 20. En d'autres termes, l'imprécision maximale tolérée est égale à 1%.

SOURCE : Illumina Cambridge Ltd., 2011

Certaines anomalies sont inhérentes à la technologie Illumina (notamment la baisse de la qualité au sein du *read* au fur et à mesure que le séquençage progresse). D'autres sont très révélatrices d'une contamination, notamment la distribution du pourcentage en bases GC, qui indique la présence de deux genres/espèces distinct(es) si cette dernière ne présente pas une distribution normale ou que deux pics sont présents. D'autres encore sont dues au support physique utilisé durant le séquençage (et notamment à la présence de bulles, ce qui interfère grandement avec la réaction de polymérisation en chaîne qui fait partie intégrante du séquençage). La qualité des fichiers fastq conditionne la qualité du génome obtenu à la dernière étape du processus d'assemblage. Il est donc d'une importance capitale de veiller à contrôler la qualité des données et si nécessaire, de les débarrasser d'un maximum d'anomalies. Certains outils permettent de mener à bien cette tâche : c'est le cas de fastp (*Chen et al., 2018*) ou encore Trimmomatic (*Bolger et al., 2014*). Tous ces logiciels sont interconnectés et font partie d'un réseau d'analyse de données, de sortes que ce qui est généré par l'un d'entre eux sert de base de travail à un autre. Ceci souligne l'importance du respect de la hiérarchie des dossiers.

Lien externe : **QR 12**

protocols.io

3.3.5. Mise au point de la **stratégie d'assemblage**

À ce jour, nombreux sont les outils qui permettent l'assemblage *de novo* d'un génome : SPAdes (*Prjibelski et al., 2020*), MegaHit (*Li et al., 2015*), SOAPdenovo2 (*Luo et al., 2012*) ou encore ABySS2 (*Jackman et al., 2017*), tous accomplissent cette tâche avec plus ou moins de succès en fonction du contexte. Certains d'entre eux intègrent des outils qui permettent la correction des erreurs dues au séquençage (**FIGURE 3.12**), c'est le cas de SPAdes avec son module BayesHammer (*Nikolenko et al., 2013*). Le Broad Institute possède également un outil fort utile quand il s'agit de corriger un assemblage : Pilon (*Walker et al., 2014*). Cette panoplie d'outils illustre assez bien la multitude de stratégies existantes pour l'assemblage *de novo* d'un génome (**FIGURE 3.13**). Afin de déterminer la meilleure stratégie d'assemblage, le génome d'une souche unique (KE005) a été assemblé en suivant 6 stratégies différentes (**TABLEAU 3O**). Les assemblages obtenus sont ensuite évalués grâce à QUAST (*Gurevich et al., 2013*). L'évaluation est basée sur la comparaison de 7 métriques (**TABLEAU 3P**). Certaines de ces métriques sont inhérentes à l'assemblage, d'autres sont obtenues grâce à la comparaison de l'assemblage à un génome de référence (et ses annotations). Le génome de référence utilisé ici est celui de *T. interdigitale*. La stratégie qui permet d'obtenir le meilleur assemblage est retenue et appliquée aux 60 génomes restants.

Lien externe : **QR 13**

protocols.io

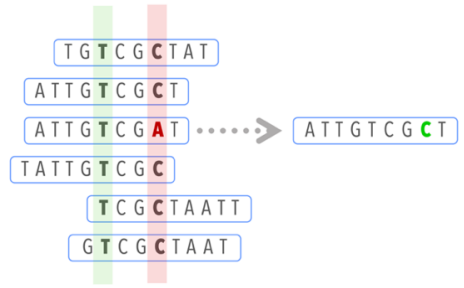


FIGURE 3.12. Principe de l'épreuve de correction des *reads*

L'épreuve de correction consiste à aligner les reads entre eux et à lire les bases qui apparaissent à une position précise. Dans la figure ci-dessus, 6 *reads* se chevauchent. En position 6 (surligné en rouge), 5 d'entre eux indiquent une cytosine. Le *read* discordant est ainsi corrigé afin de gommer cette erreur dans la séquence *consensus* qui en résulte (à droite du schéma).

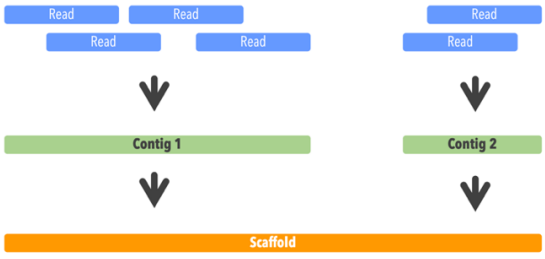


FIGURE 3.13. Principe de l'assemblage *de novo*

L'assemblage *de novo* consiste à aligner les reads entre eux afin de déterminer une séquence d'ADN continue et ordonnée issue du chevauchement des *reads* alignés. Cette séquence forme un *contig*, terme dérivé de l'anglais « *contiguous clones* ». L'étape suivante consiste à ordonner et orienter ces *contigs* afin de reconstituer l'entièreté du génome. La taille des séquences ainsi obtenues est plus conséquente que celle des contigs : il s'agit alors de *scaffolds*.

TABLEAU 30. Stratégies explorées pour l'assemblage du génome

	Stratégie	Préfixe des fichiers de sortie
1	Filtré sur **fastp** | Assemblé sur **SPAdes** | Non-corrigé	01_SP_unc
2	Filtré sur **fastp** | Assemblé sur **SPAdes** | Corrigé sur **BayesHammer**	02_SP_cor_BH
3	Filtré sur **fastp** | Assemblé sur **SPAdes** | Corrigé sur **Pilon**	03_SP_cor_PI
4	Filtré sur **fastp** | Assemblé sur **MEGAHIT** | Non-corrigé	04_MG_unc
5	Filtré sur **fastp** | Assemblé sur **MEGAHIT** | Corrigé sur **Pilon**	05_MG_cor_PI
6	Assemblé sur **WGST**	06_WGST

TABLEAU 3P. Métriques utilisées pour l'évaluation des assemblages obtenus

	Métrique	Interprétation
1	Nombre de contigs	Les meilleurs assemblages ont moins de contigs (mais ils sont plus grands)
2	N50	Les meilleurs assemblages ont une valeur élevée de N50
3	Taille du plus grand contig	Les meilleurs assemblages ont de grands contigs
4	Taille totale du génome assemblé	Généralement, plus la taille est grande, meilleur est l'assemblage
5	Nombre de caractéristiques génétiques	Plus le nombre de caractéristiques est grand, meilleur est l'assemblage
6	Nombre de mismatches	Moins il y'a de mismatches, plus la qualité de l'assemblage est élevée
7	Taille totale non-alignée	Plus cette valeur est petite, meilleur est l'assemblage

3.3.6. Analyse des **marqueurs** moléculaires

Cette étape nécessite l'utilisation d'un ordinateur interne au service de microbiologie étant donné que le logiciel nécessaire (WGST) n'est accessible que depuis le réseau interne du CHU de Liège. La première étape consiste à créer un échantillon dans la DB, puis à y associer les reads correspondants sous forme de 2 fichiers fastq.gz. Après chargement sur le serveur, les 2 fichiers subissent un filtrage avec fastp suivi d'un assemblage *de novo* avec SPAdes. Les séquences protéiques de 8 marqueurs moléculaires d'intérêt sont ensuite recherchées au sein du génome assemblé grâce à l'algorithme tBLASTn (*Altschul et al., 1990*). Un seuil de détection est configuré au sein du programme. Ce dernier est tel qu'en dessous de 60% d'identité (ou 20% de couverture), le marqueur recherché est considéré absent. Le cas échéant, le programme affiche « *below tresholds* » pour ce marqueur. Par ailleurs, un code couleur permet la lecture rapide du résultat (***FIGURE 3.14***). Pour l'analyse du gène codant la SQLE, le programme recherche les 4 mutations suivantes : L393, F397, F415 et H440. Lorsqu'aucune d'entre-elles n'est détectée, le programme affiche le message « *SQLE WildType* ». Puisque le programme ne recherche que ces 4 mutations, une analyse manuelle du marqueur SQLE est effectuée en parallèle grâce à l'algorithme tBLASTn. En utilisant ce dernier, il est possible de rechercher la présence de la protéine (GenBank BAL48859.1) au sein du génome assemblé. Un alignement permet ensuite de détecter les mutations donnant lieu à un changement d'acide aminé au sein de cette protéine. Cette manipulation permettra au mieux de détecter de nouvelles mutations non ciblées par le programme WGST et, au pire, de confirmer les résultats obtenus par ce dernier. Parmi les 8 marqueurs d'intérêt recherchés figurent 5 gènes de métalloprotéases (Mep1, Mep2, Mep3, Mep4 et Mep5) ainsi qu'un gène de subtilisine (Sub6). Le 7ème marqueur est le gène de la SQLE, enzyme impliquée dans l'émergence de la résistance à la terbinafine. Enfin, un 8ème marqueur est recherché : il s'agit du gène du transporteur TruMDR3, impliqué dans l'émergence de la résistance aux dérivés azolés. Dans les faits, cette résistance est médiée par une surexpression de ce gène.



FIGURE 3.14. Interface graphique de WGST

Le logiciel permet le chargement des fichiers fastq.gz générés par le séquençage à haut-débit du génome. Ces données sont filtrées afin d'en écarter les bases dont la qualité n'est pas suffisante. Ensuite, le génome est automatiquement assemblé et 8 marqueurs moléculaires sont recherchés au sein de ce génome. Il est également possible de classer ce génome grâce à un dendrogramme prenant en considération d'autres génomes préalablement assemblés au sein du logiciel.

L'outil WGST ne permettant, à ce stade, que la détermination de la présence ou de l'absence de ce marqueur, les résultats de l'analyse du gène TruMDR3 seront écartés dans ce travail. Dans la suite de ce travail, seuls les 7 premiers marqueurs seront considérés.

3.3.7. Classification des souches étudiées

Cette étape allie plusieurs approches bio-informatiques afin de tenter de discriminer les espèces phylogénétiquement proches étudiées (*T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*). Certaines de ces approches étudient le génome des souches dans sa globalité (approches phylogénomiques) tandis que d'autres sont basées sur un seul gène (approches phylogénétiques).

3.3.7.1. Approches phylogénomiques

La première de ces méthodes (PHYL | WGST) fait également office de référence au sein de ce travail : il s'agit de la construction d'un dendrogramme sur base des génomes assemblés des dermatophytes étudiés. Ce dernier inclus 11 génomes de référence en plus des souches sélectionnées pour l'étude. Puisqu'elle se base sur l'intégralité du génome, cette approche est considérée comme étant la plus fiable pour la discrimination des espèces phylogénétiquement proches. Néanmoins, l'arbre obtenu peut être difficile à interpréter étant donné que les limites entre les espèces ne sont pas toujours clairement définies. Pour pallier cela, une seconde approche, elle aussi basée sur le génome entier, a été étudiée (PHYL | ANI). Celle-ci consiste à comparer le génome du dermatophyte étudié aux génomes de référence de 12 espèces de dermatophytes. Cette comparaison, réalisée par l'outil fastANI, permet la mesure d'une métrique pour chacune des 12 comparaisons effectuées : il s'agit de l'ANI. Sans entrer dans les détails, cette métrique est le reflet de la similarité entre les 2 génomes comparés. Plus sa valeur est élevée, plus les génomes comparés sont proches l'un de l'autre. Ainsi, la plus haute valeur d'ANI qui résulte des 12 comparaisons qu'aura subi le génome d'une souche étudiée correspond à l'identification de l'espèce à laquelle elle appartient. Cette approche résous le problème des limites entre les espèces puisqu'il résultera nécessairement une seule valeur maximale d'ANI et, par extension, une seule identification pour chaque souche étudiée. Néanmoins, ce qui fait la force de ces 2 premières approches fait également leur faiblesse. Puisqu'elles sont basées sur l'étude du génome entier, ces méthodes nécessitent un séquençage à haut-débit au préalable, ce qu'il n'est pas toujours possible de mettre en place dans le cadre d'une identification de l'espèce.

3.3.7.2. Approches phylogénétiques

Pour pallier les faiblesses des 2 méthodes précédemment abordées, 3 séquences d'ADN ont été sélectionnées pour faire l'objet d'une étude dans le cadre de la discrimination entre les espèces du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. Il s'agit des séquences ITS1/ITS2 ainsi que la séquence TEF1a. La première étape consiste à extraire ces séquences des génomes étudiés. A cette fin, 2 techniques co-existent (**TABLEAU 3Q**). La première concerne les séquences ITS1/ITS2 et consiste à utiliser ITSx, un programme qui fait appel au modèle de Markov caché pour prédire les bases appartenant au fragment ITS1/ITS2, permettant par la suite l'extraction de ces dernières. La seconde technique est appliquée pour extraire la séquence du gène TEF1a. Elle est basée sur l'utilisation d'un algorithme d'alignement de séquences, BLASTn (nucléotide : nucléotide), en prenant en compte une séquence de référence (le génome assemblé) pour y rechercher une séquence d'intérêt (GenBank KM678062.1). Dans les 2 cas, la séquence extraite est renseignée dans un fichier .fasta où le *header* correspond au numéro partiel du dermatophyte étudié. Elles seront analysées selon 8 approches d'identification différentes (**TABLEAU 3R**).

TABLEAU 3Q. Méthodes d'extraction des séquences

Séquence	Méthode d'extraction
ITS1	Prédiction de l'ADN ribosomique par BLASTn (ref. : GenBank MH708281.1) suivi d'une extraction par ITSx
ITS2	
TEF1a	Prédiction par BLASTn (ref. : GenBank KM678062.1)

TABLEAU 3R. Approches d'identification étudiées

Approche	Séquence	DB	Méthodologie
01 | ITS1 | WI	ITS1	WI	Alignement de la séquence étudiée au sein de la DB par l'algorithme BLASTn. Les 3 premiers résultats obtenus sont retenus pour l'identification de l'espèce.
02 | ITS2 | WI	ITS2		
03 | ITS1 | NCBI	ITS1	NCBI	
04 | ITS2 | NCBI	ITS2		
05 | TEF1a | NCBI	TEF1a		
06 | ITS1 | MLT	ITS1		Alignement multiple des séquences par l'algorithme *MAFFT* + inférence de l'arbre par RAxMLGUI
07 | ITS2 | MLT	ITS2		
08 | TEF1a | MLT	TEF1a		

La première approche (01 | ITS1 | WI) consiste à aligner les séquences ITS1 au sein de la DB du WI. La seconde (02 | ITS2 | WI) procède de la même manière pour les séquences ITS2.

Les 3 premières identifications obtenues sont retenues. Les approches 03 | ITS1 | NCBI, 04 | ITS2 | NCBI et 05 | TEF1a | NCBI consistent à aligner respectivement les séquences ITS1, ITS2 et TEF1a au sein de la DB du NCBI. A nouveau, seules les 3 premières identifications sont retenues. A ce stade, le résultat obtenu est retenu si et seulement si, d'une part, les 3 premières identifications correspondent à une seule et même espèce et d'autre part, le score de similarité des séquences alignées est supérieur à 95%. Dans le cas contraire, la souche est considérée comme non-identifiée. Enfin, les approches 06 | ITS1 | MLT, 07 | ITS2 | MLT et 08 | TEF1a | MLT consistent à construire un arbre par maximum de vraisemblance grâce au logiciel RAxMLGUI en se basant respectivement sur les séquences ITS1, ITS2 et TEF1a (d'où le nom de l'approche, MLT pour *Maximum Likelihood Tree*). Pour ce faire, les séquences sont d'abord alignées entre-elles grâce à l'algorithme *MAFFT* (paramètres par défaut), ce qui génère un fichier à extension .aln. Ce dernier est lu par RAxMLGUI, qui infère un arbre sur base de l'alignement (***TABLEAU 3S***). L'arbre est exporté sous format .bestTree et peut être lu grâce à iTOL, un service en ligne permettant l'édition des dendrogrammes. Pour ces 3 dernières approches, des séquences de référence sont incorporées dans les arbres pour faciliter l'interprétation de ces derniers. L'avantage de cette méthodologie basée sur la construction d'un dendrogramme est une identification indépendante d'une quelconque DB. Pour ces méthodes, l'identification obtenue est retenue si et seulement si le dendrogramme permet une séparation efficace des espèces qui forment le complexe étudié. Ceci se traduit par la formation de clades distincts. Il suffit alors de relever le clade dans lequel la souche se classe pour obtenir l'identification de l'espèce à laquelle elle appartient.

TABLEAU 3S. Paramètres de RAxML GUI

Paramètre	Valeur
Modèle de substitution	GTR
Taux d'hétérogénéité	Gamma (moyen)
Analyse	Inférence d'un arbre ML
Exécutions	500x
Groupe externe	D15P127
Seed	500 000

3.3.7.3. Mesure de la performance des approches

Pour chacune des 8 approches d'identification testées, une mesure de la performance sera réalisée. Dans ce contexte, la performance est définie comme étant le pourcentage d'identification correcte (qui, par extension, correspond à une concordance avec l'identification obtenue par l'approche PHYL | WGST). Ainsi, plus les identifications obtenues par la méthode phylogénétique se rapprochent de celles obtenues par la méthode phylogénomique PHYL | WGST, plus celle-ci est dite performante. Graphiquement, cette mesure sera représentée sous forme d'un diagramme circulaire composé de 3 anneaux, dont 1 anneau complet et 2 anneaux partiels (***FIGURE 3.15***). L'anneau interne (niveau 1) représente le ratio identifications retenues (bleu) par rapport aux identifications écartées (rouge) pour non-respect des critères d'inclusion. Parmi les souches dont l'identification a été retenue, l'anneau médian (niveau 2) représente le pourcentage d'identifications correctes (qui, par extension, concordent avec les identifications obtenues par la méthode phylogénomique PHYL | WGST). Enfin, l'anneau externe (niveau 3) représente la répartition des espèces parmi les dermatophytes dont l'identification s'est avérée correcte.

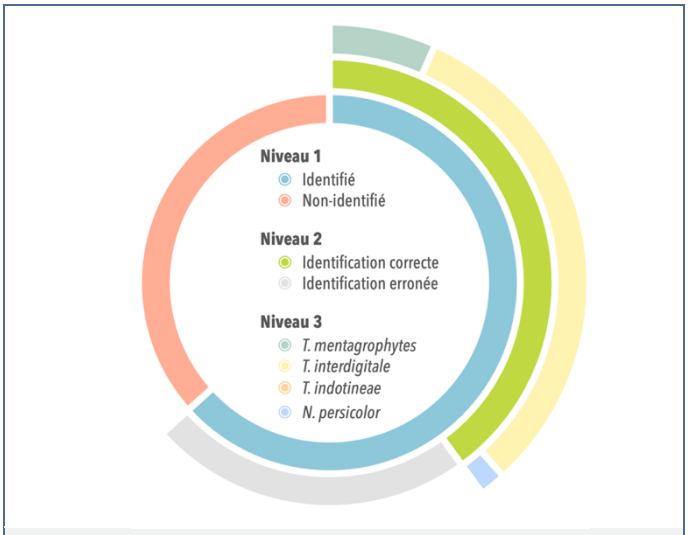


FIGURE 3.15. Exemple de graphique obtenu pour l'analyse de la performance

Le graphique est une superposition de 3 anneaux. L'anneau interne (niveau 1) indique le pourcentage de souches pour lesquelles l'identification à été retenue par rapport au nombre de souches dont l'identification a été écartée. L'aneeau médian (niveau 2) est une représentation du pourcentage d'identifications correctes parmi les identifications retenues. L'anneau externe (niveau 3) est indique la distribution des espèces au sein des identifications retenues qui se sont avérées correctes. La performance de la méthode est reflétée par la taille de l'anneau médian vert. Plus ce dernier est complet, plus la méthode est dite efficace.

RÉSULTATS

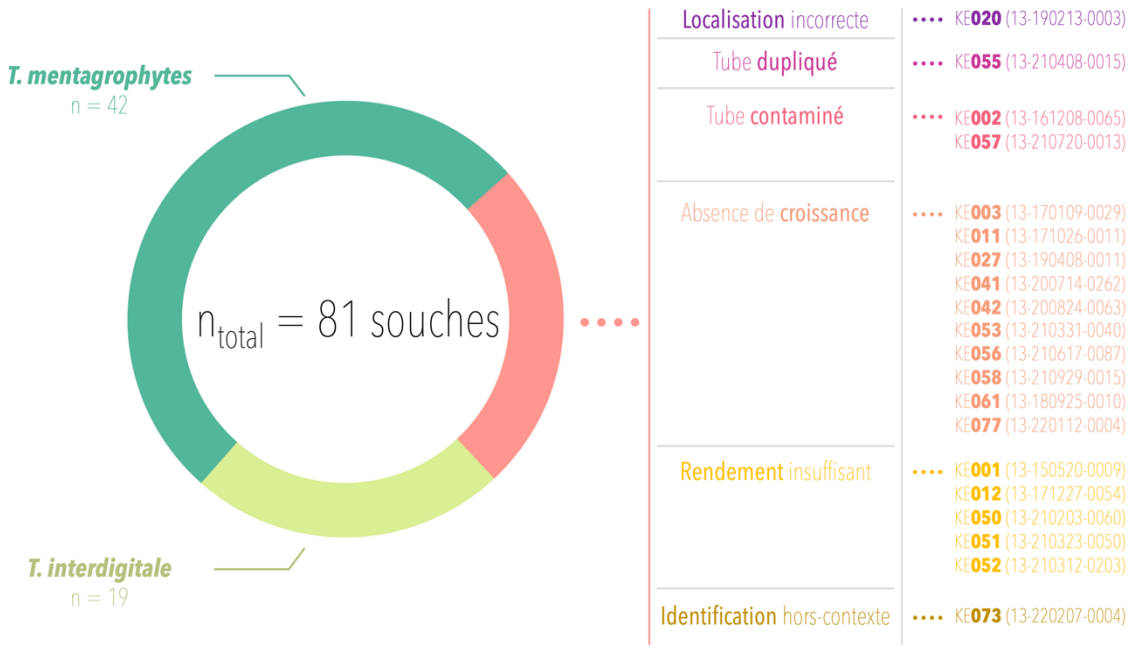


FIGURE 4.01. Répartition attendue des 61 souches de dermatophytes étudiées

L'échantillon final est composé de 61 souches de dermatophytes, dont 42 souches de *T. mentagrophytes* et 19 souches de *T. interdigitale*. Cette répartition ne correspond néanmoins pas à la répartition finale, puisque la majorité des dermatophytes étudiés ont été caractérisés par microscopie. Parmi les 20 souches écartées de l'étude, la souche KE020 a été exclue pour localisation incorrecte du tube en champithèque, la souche KE055 a été exclue car il s'agissait d'un dupliquât, les souches KE002 et KE057 ont été exclues car les tubes de départ étaient contaminés, les souches KE003, KE011, KE027, KE041, KE042, KE053, KE056, KE058, KE061 et KE077 ont été exclues car aucune croissance n'a été observée malgré plusieurs tentatives de mise en culture. Les souches KE001, KE012, KE050, KE051 et KE052 ont été exclues car le rendement d'extraction de l'ADN fût insuffisant. La souche KE073 fut exclue car l'identification obtenue sur base de l'ITS2 (*T. tonsurans*) ne correspondait pas au contexte de cette étude (*T. mentagrophytes*, *T. interdigitale* et éventuellement *T. indotineae*).

TABLEAU 4A. CMI obtenues par la méthode de microdilution pour les souches résistantes

N° partiel	N° GLIMS	Terbinafine	Sensibilité à la terbinafine
KE**028**	13-190419-0055	> 8 µg/mL	**Résistant**
KE**035**	13-191217-0023	< 0,008 µg/mL	**Sensible**
KE**059**	13-180730-0023	2 µg/mL	**Résistant**
KE**063**	IHEM n°28378		**Résistant**
KE**064**	IHEM n°28379		**Résistant**
KE**065**	IHEM n°28380		**Résistant**
KE**067**	IHEM n°28384		**Résistant**
KE**069**	13-210408-0015	> 8 µg/mL	**Résistant**
KE**070**	13-210507-0223	> 8 µg/mL	**Résistant**
KE**075**	13-220207-0005	2 µg/mL	**Résistant**

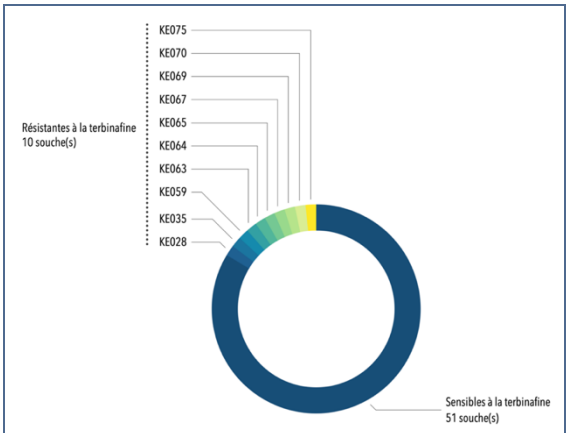


FIGURE 4.02. Répartition des souches selon leur sensibilité à la terbinafine

La méthode de *screening* par dilution sur gélose a permis de mettre en évidence 10 souches résistantes à la terbinafine. Parmi celles-ci, la souche KE035 a donné lieu à une croissance au sein des deux premiers puits. Face à ce résultat douteux, il a été décidé de considérer cette dernière comme étant résistante et de procéder à une confirmation du profil de résistance grâce à la méthode de référence (microdilution en milieu liquide).

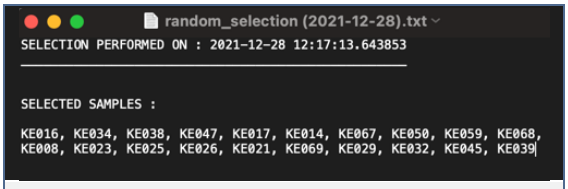


FIGURE 4.03. Résultats de la sélection aléatoire

La sélection fait suite à l'exécution du script random_select.py, lequel crée un fichier où est enregistrée la sélection aléatoire demandée (n = 20)

4.1. Mise en **culture** des souches de dermatophytes

Au total, 81 souches de dermatophytes conservées à -80°C dans la champithèque du CNR, ont été mises en culture sur milieu Sabouraud-agar. Parmi celles-ci, 20 souches ont dû être écartées pour diverses raisons (***FIGURE 4.01***). L'étude a donc été menée sur un échantillon composé de 61 souches de dermatophytes. Le principal motif d'exclusion est l'absence de croissance après 10 jours de culture.

4.2. ***Screening*** du profil de **résistance** à la **terbinafine**

Le profil de résistance à la terbinafine a été déterminé parmi les 61 souches de dermatophytes mises en culture. Au total, 10 souches résistantes ont été mises en évidence via la méthode de *screening* de dilution sur gélose (***FIGURE 4.02***). Parmi celles-ci, les souches KE035 et KE028 n'ont donné lieu à une croissance qu'au sein des 2 premiers puits. Face à ce résultat douteux, il a été décidé de procéder à une caractérisation par la méthode de référence. Parmi ces 10 souches détectées comme étant résistantes, 4 sont des souches de référence de la collection de Sciensano (BCCM/IHEM). A ce titre, ces souches ont fait l'objet d'une caractérisation au préalable par la méthode EUCAST E.Def 11.0. La manipulation n'est donc pas réitérée pour ces souches. Chacune des plaques utilisées a été photographiée et annotée. Le document regroupant ces photographies est accessible en ligne grâce au lien ci-contre.

4.3. **Antifongigramme** EUCAST E.Def. 11.0

Lien externe : **QR 14**

Parmi les 10 souches détectées comme étant résistantes (ou douteuses) à la terbinafine grâce à la méthode de dilution sur gélose, 6 ont fait l'objet d'une caractérisation par la méthode de référence (EUCAST E.Def 11.0). Les résultats sont rapportés dans le tableau ci-contre (***TABLEAU 4A)***. La souche KE035, initialement détectée comme étant résistante à la terbinafine, s'est avérée sensible à la suite de la caractérisation par la méthode de référence en microdilution, dont la spécificité est supérieure à cette de la méthode de *screening*. Concernant les souches KE028, KE059, KE069, KE070 et KE075, toutes se sont avérées résistantes à la terbinafine par cette méthode avec des CMI allant de 2 µg/mL à plus de 8 µg/mL. Pour rappel, le *breakpoint* pour la terbinafine au sein de ce complexe est de 0,125 µg/mL (*The EUCAST, 2022*). En plus de la terbinafine, la souche KE028 s'est avérée résistante à l'itraconazole, un antifongique de la classe des dérivés azolés dont le *breakpoint* est situé à 0,25 µg/mL pour cette espèce (*The EUCAST, 2022*). Pour cet antifongique, la CMI expérimentalement obtenue est de 0,5 µg/mL. Le classeur regroupant à la fois les données spectrophotométriques brutes ainsi que l'interprétation qui en résulte est disponible, pour chaque souche, via le lien ci-contre.

4.4. Mise au point de l'**extraction** de l'ADN

Avant de progresser dans l'extraction de l'ADN des dermatophytes, il est nécessaire de déterminer quelle méthodologie donne les meilleurs résultats en termes de rendement d'extraction. Pour répondre à cette question, 20 souches de dermatophytes ont été sélectionnées aléatoirement (***FIGURE 4.03***) afin de subir une double extraction en vue d'une comparaison ultérieure des résultats obtenus avec chacun des 2 kits utilisés (NucleoSpin et DNEasy). Une attention particulière a été accordée aux conditions de croissance afin que ces dernières soient sensiblement identiques d'un kit à l'autre. L'ADN des 20 souches est extrait selon le protocole du kit NucleoSpin/DNEasy et est ensuite quantifié par spectrophotométrie à 260nm. Les résultats sont rapportés dans une table de comparaison (***TABLEAU 4B***). Pour une même souche, le rendement d'extraction est tantôt plus élevé avec le kit NucleoSpin et tantôt plus élevé avec le kit DNEasy. Cependant, lorsque ces données sont présentées graphiquement, il apparaît que le rendement d'extraction obtenu avec le kit DNEasy est en moyenne supérieur à celui obtenu avec le kit NucleoSpin (***FIGURE 4.04***). Cela étant, il n'est pas avisé de tirer une conclusion directement sur base de ce graphique sans passer par une analyse plus poussée afin de déterminer s'il s'agit ou non d'une différence statistiquement significative. Pour ce faire, la première étape consiste à déterminer la distribution des données au sein de chacun des 2 groupes (formés selon le kit d'extraction utilisé). Pour y répondre, 6 indicateurs de normalité sont exploités (***TABLEAU 4C***). Tous convergent vers une seule et même conclusion : un rejet de la normalité et ce, dans les 2 groupes. Par conséquent, le test statistique adéquat est une alternative non-paramétrique au test de Student pour échantillons appariés : le test des rangs signés de Wilcoxon.

TABLEAU 4B. Comparaison des rendements d'extraction de l'ADN entre le kit NucleoSpin et le kit DNEasy

N°	GLIMS	Concentration (ng/µL)		A_{260} / A_{280}		A_{260} / A_{230}	
		NucleoSpin	DNEasy	NucleoSpin	DNEasy	NucleoSpin	DNEasy
KE**016**	13-180604-0007	1,78	9,41	1,33	1,82	0,53	1,48
KE**034**	13-191224-0067	20,73	8,81	1,59	1,61	0,71	1,41
KE**038**	13-200529-0132	1,85	11,14	1,60	1,95	0,48	1,43
KE**047**	13-201125-0225	2,74	7,13	1,92	1,55	0,56	1,14
KE**017**	13-180817-0102	14,37	8,38	1,53	2,21	0,70	1,88
KE**014**	13-180209-0032	3,01	12,35	2,80	2,03	0,47	1,99
KE**067**	IHEM n°28384	13,69	16,31	1,82	2,16	1,68	1,53
KE**050**	13-210203-0060	5,12	5,25	2,42	2,25	1,22	0,92
KE**059**	13-180730-0023	4,33	7,67	1,41	1,97	1,08	1,08
KE**068**	IHEM n°28388	8,67	28,66	2,02	2,25	1,73	1,52
KE**008**	13-170710-0034	6,54	25,03	1,60	2,05	1,21	1,51
KE**023**	13-190226-0091	5,98	10,34	2,02	1,82	1,13	1,3
KE**025**	13-190228-0018	3,57	8,53	1,44	1,7	0,82	1,8
KE**026**	13-190326-0052	2,54	16,35	9,21	1,92	0,69	1,51
KE**021**	13-190220-0076	12,15	4,59	2,02	2,52	1,67	0,34
KE**069**	13-210408-0015	10,7	6,18	1,97	3,63	1,77	1,29
KE**029**	13-190523-0057	1,99	18,26	4,96	1,72	0,60	0,92
KE**032**	13-191127-0046	5,47	11,5	2,13	1,69	1,14	1,59
KE**045**	13-201125-0228	3,05	13,68	2,45	1,89	0,88	1,4
KE**039**	13-200803-0093	4,81	13,79	1,96	2,1	1,21	1,64

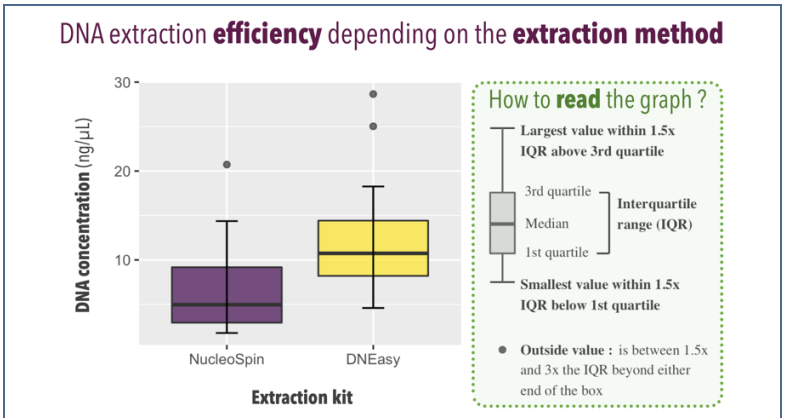


FIGURE 4.04. Comparaison du rendement d'extraction en fonction du kit utilisé

Le rendement d'extraction du kit DNEasy semble supérieur à celui du kit NucleoSpin. Néanmoins, il faut effectuer une analyse de statistique inférentielle pour confirmer ou infirmer cette observation. Ce graphique est construit grâce à ggplot2 (*Wickham, 2016*).

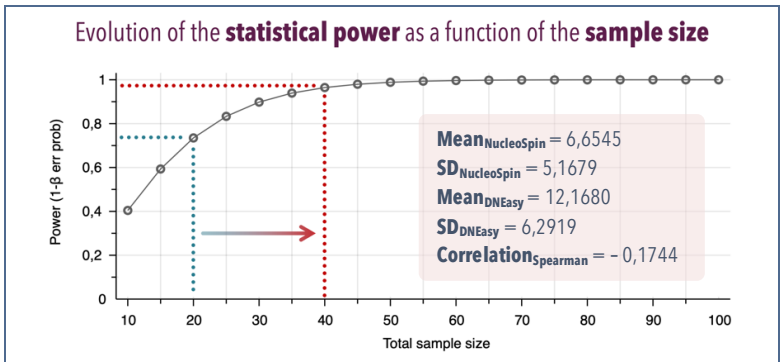


FIGURE 4.05. Évolution de la puissance statistique en fonction de la taille de l'échantillon

Les paramètres situés dans le cadre rouge ont servi à déterminer la taille d'effet. L'évolution de la puissance est ensuite calculée sur base d'un taille d'effet de 0,6257 et d'un niveau d'incertitude de 5%. Dans ces conditions, la puissance statistique obtenue est de 73,47%. En traitant 11 souches supplémentaires, la puissance atteint le seuil requis de 90%. En doublant le nombre d'échantillons traités, la puissance statistique atteint 96,45%. Cette analyse est réalisée grâce au logiciel G*Power (*Faul et al., 2007*).

L'hypothèse nulle (H_0) et l'hypothèse alternative (H_1) de ce test sont les suivantes :

$$H_0 : Médiane_{NucleoSpin} = Médiane_{DNEasy}$$
$$H_1 : Médiane_{NucleoSpin} \neq Médiane_{DNEasy}$$

Le test est réalisé en prenant en compte un niveau d'incertitude α égal à 5%. La p-valeur obtenue vaut $p = 0{,}01362$. Dans ces conditions, l'hypothèse nulle est rejetée puisque $p < \alpha$, ce qui permet de conclure d'une part qu'il existe une différence en termes de rendement d'extraction entre les deux méthodes et d'autre part, que cette différence est statistiquement significative. Cependant, ceci est à nuancer à la lumière d'une notion supplémentaire : la puissance statistique. La puissance est définie comme étant la probabilité que l'hypothèse nulle (H_0) soit rejetée lorsqu'il existe effectivement une différence ou une association réelle. En pratique, le seuil d'acceptation est généralement fixé à 90%. Avec une taille d'échantillon de 20 souches de dermatophytes, la puissance statistique obtenue est égale à 73,47%. Cette puissance étant inférieure au seuil de 90%, il est impossible d'exclure que la différence observée en termes de rendement d'extraction soit due à une variabilité d'échantillonnage et ce, malgré qu'elle soit statistiquement significative. L'une des solutions qui peut être envisagée à ce stade est l'augmentation de la taille d'échantillons. Au total, 31 échantillons suffisent (***FIGURE 4.05***) pour atteindre le seuil requis de 90% pour la puissance statistique. Au vu des différents éléments précédemment cités, il a été décidé d'extraire l'ADN de l'intégralité des dermatophytes de l'étude avec le kit d'extraction DNEasy afin d'en maximiser la concentration. Les résultats ont été encodés dans un classeur accessible grâce au lien ci-dessus.



4.5. Caractérisation par séquençage du segment ITS2

Afin d'identifier et/ou confirmer l'identification, le séquençage Sanger de la région ITS2 a été réalisé. Cette méthode d'identification est basée sur un alignement de séquence au sein de la DB du WI grâce à l'algorithme BLASTn. Les résultats obtenus ont été encodés dans un classeur accessible en ligne grâce au lien ci-contre. Hormis la souche KE073 qui fut identifiée comme appartenant à l'espèce *T. tonsurans* (et qui fut dès lors écartée de l'étude comme l'illustre la ***FIGURE 4.01***), tous les dermatophytes de l'étude ont été identifiés comme appartenant au complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. Une identification non-concluante a été obtenue pour la souche KE060, qui s'est vue identifiée à la fois comme appartenant à l'espèce *Nannizzia persicolor* et *Trichophyton mentagrophytes*. Afin d'éclaircir les raisons de cette discordance, cette souche a été maintenue parmi les dermatophytes de l'étude. A ce stade de l'étude, la discrimination entre les espèces du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* n'est pas recherchée. Les discordances entre les identifications attendues et obtenues ne sont donc pas prises en compte.

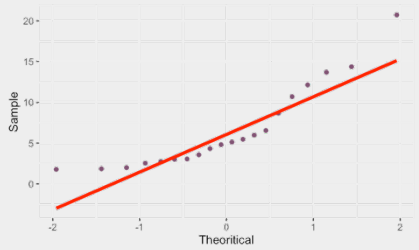
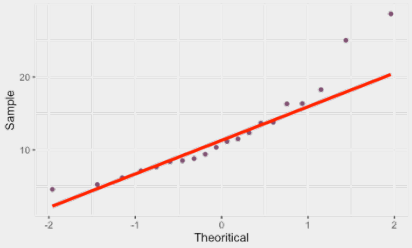
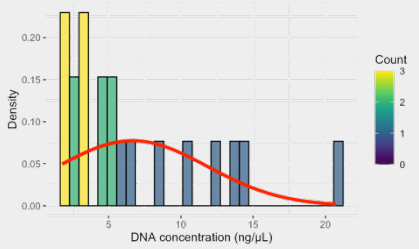
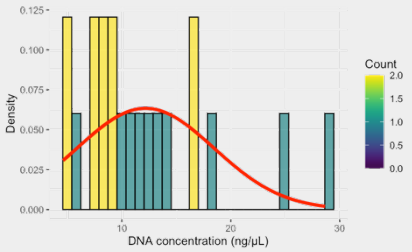
4.6. Contrôle des données du NGS

Lors du séquençage à haut-débit, l'un des paramètres importants à considérer est la profondeur du séquençage (***FIGURE 4.06***). Globalement, plus la profondeur est élevée, plus les séquences consensus obtenues par l'alignement des *reads* sont fiables. Pour les dermatophytes de cette étude, les génomes ont été séquencés à une profondeur moyenne de 25x (***FIGURE 4.07***). Les fichiers générés contiennent approximativement 7 millions de reads, dont 30% de *reads* dupliqués et 70% de *reads* uniques (***FIGURE 4.08***). L'examen de l'intégrité des données basé sur la comparaison des *hash* md5 a permis d'écarter un quelconque problème durant le transfert et indique que les données sont intègres.

4.6.1. Contrôle de contamination

La distribution du pourcentage en bases GC est analysée et ce, grâce à fastQC. Cette dernière adopte une distribution normale au sein d'une même espèce. A l'inverse, l'apparition de pics parasites signe la présence d'une contamination au sein des *reads*. Dans le cas de cette étude, la majorité des souches semblent présenter un pourcentage en bases GC dont le pic est proche de 48,2% (qui correspond au pourcentage en bases GC des dermatophytes du genre *Trichophyton*). Néanmoins, un léger pic parasite entre 20% et 30% de GC semble présent (***FIGURE 4.09***). Ce pic est surtout visible pour la souche KE017 (***FIGURE 4.10***). L'étendue de cette contamination a été évaluée grâce à Kraken2, un programme de classification taxonomique des *reads* dont l'usage peut être détourné pour en faire un outil de détection de contamination. Les résultats indiquent que la majorité (95%) des *reads* du génome KE017 n'ont aucune correspondance dans la DB du programme. Cependant, ceci est normal dans la mesure où la DB utilisée ne contient pas les séquences du genre *Trichophyton*.

TABLEAU 4C. Analyse de la distribution des données au sein des 2 groupes formés selon le kit d'extraction

Indicateur de normalité	NucleoSpin	DNEasy
Moy. vs Méd.	6,65 vs 4,96	12,17 vs 10,74
Coefficient d'asymétrie	Positif	Positif
Diagramme Q-Q		
Shapiro-Wilk	p = 0,0039	p = 0,0231
Jarque-Bera	p = 0,0533	p = 0,0575
Histogramme		

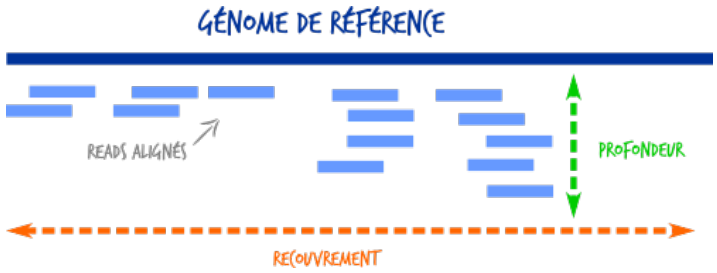


FIGURE 4.06. Différence entre profondeur et recouvrement du séquençage

La profondeur du séquençage est définie comme étant le nombre moyen de *reads* qui se superposent sur l'intégralité du génome. Le recouvrement représente quant à lui le pourcentage du génome de référence que la séquence consensus issue du séquençage a été capable de recréer.

SOURCE : Schutz, 2017

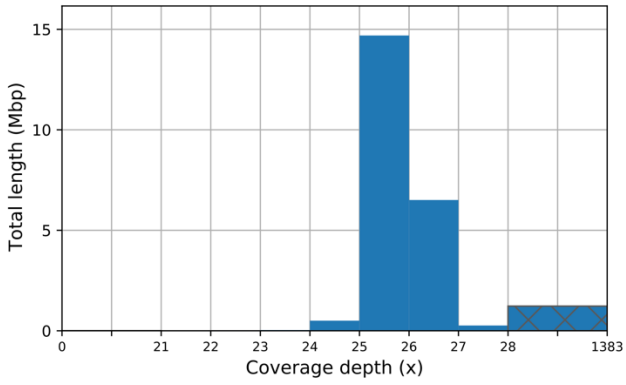


FIGURE 4.07. Profondeur de séquençage pour la souche KE005

Ce graphe a été construit sur base d'une comparaison en considérant le génome de référence du *T. interdigitale*. Dans ces conditions, le graphique montre une profondeur de séquençage moyenne de 25x. Les résultats obtenus pour les autres dermatophytes sont similaires à celui-ci.

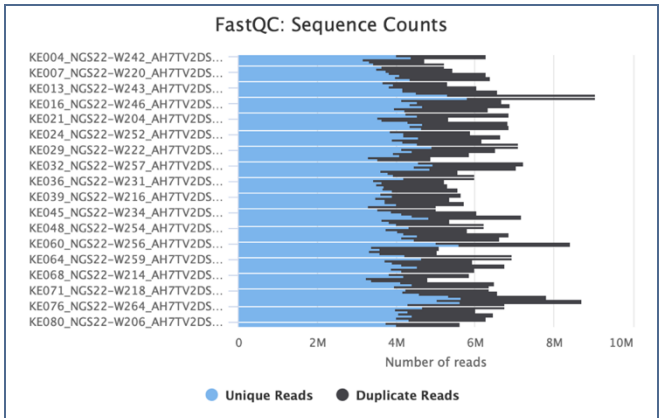


FIGURE 4.08. Statistiques des fichiers générés par le NGS

Le graphique est construit sur base de l'analyse de tous les fichiers fastq.gz par FastQC (*Andrews, 2010*) suivi d'une fusion de tous les rapports obtenus par MultiQC (*Ewels et al., 2016*). L'abscisse représente une valeur absolue tandis que l'ordonnée représente le fichier considéré.

En pratique, pour ce qui est des dermatophytes, l'usage de Kraken2 permet surtout d'écarter une contamination bactérienne ou encore fongique (notamment par spores d'*Aspergillus*, un champignon couramment isolé au CNRML et qui peut facilement contaminer les cultures). L'analyse de Kraken2 indique que 5% des reads sont issus de matériel génétique de contaminants, dont 2% de procaryotes et 3% d'eucaryotes (***FIGURES 4.11 & 4.12***). Ceci est à nuancer à la lumière d'un élément supplémentaire : les séquences de faible complexité (une chaîne nucléotidique de 31 adénines, à titre d'exemple). Ces dernières ont tendance à générer des faux-positifs lorsque Kraken2 est utilisé en tant que détecteur de contamination. Il convient donc d'apprécier la proportion de ces contaminations afin de juger si les données sont viables pour un assemblage *de novo*. Dans le cas actuel, ces contaminations représentent une minorité. Par conséquent, il a été décidé que les données sont viables pour la poursuite des analyses bio-informatiques en aval.

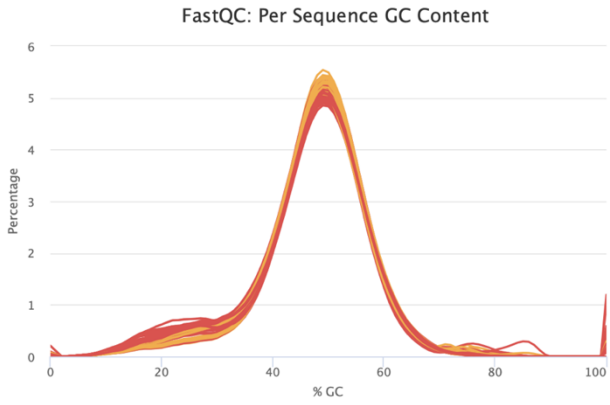


FIGURE 4.09. Distribution du %GC des *reads* pour les souches de l'étude

Le graphique est construit sur base de l'analyse de tous les fichiers fastq.gz par FastQC (***Andrews, 2010***) suivi d'une fusion de tous les rapports obtenus par MultiQC (***Ewels et al., 2016***). Une librairie correctement préparée devrait avoir une distribution Gaussienne du pourcentage en bases GC.

4.6.2. Contrôle des scores de qualité

L'examen des scores de qualité des séquences contenues dans les fichiers .fastq montre des fichiers dont les scores de qualité sont élevés. Pour chacune des 151 positions des *reads*, le score de qualité sont supérieurs à 30 (***FIGURE 4.13***). La même observation peut être faite pour les scores de qualité global par *reads* (***FIGURE 4.14***). Cette figure laisse apparaître que la majorité des *reads* ont un score global de 36, ce qui correspond à l'insertion d'une seule base erronée sur un total de 4000 bases (soit une probabilité d'erreur de 0,025%).

4.7. Mise au point de la stratégie d'assemblage

Pour déterminer l'approche adéquate pour l'assemblage, le génome d'une seule souche (n° partiel KE005) a été assemblé en suivant 6 approches différentes. Pour chacune des approches, le génome utilisé a été filtré au préalable par fastp, un outil de filtrage automatique des *reads*. Les assemblages sont ensuite comparés entre eux grâce à QUAST (***Gurevich et al., 2013***), un outil d'évaluation d'assemblages *de novo*. L'évaluation est basée sur 7 métriques. Le résultat de cette comparaison montre que les assemblages effectués avec l'outil MEGAHIT ont une qualité inférieure à ceux effectués avec l'outil SPAdes (***TABLEAU 4D***). Pour ce qui est du module de correction, lorsque la dernière métrique est considérée (taille totale non-alignée), il apparaît que le module de correction intégré à SPAdes (Bayes Hammer) est plus performant que le module de correction Pilon (seule différence qui peut justifier l'écart observé sur la métrique n°7 entre les approches 02_SP_cor_BH et 03_SP_cor_PI).

TABLEAU 4D. Comparaison des 6 assemblages obtenus grâce à l'outil d'évaluation QUAST

	01_SP_unc	02_SP_cor_BH	03_SP_cor_PI	04_MG_unc	05_MG_cor_PI	06_WGST
# Contigs	270	281	270	536	536	288
N50	185 774 bases	176 996 bases	185 774 bases	107 331 bases	107 331 bases	176 668 bases
Largest contig	677 493 bases	587 090 bases	677 493 bases	501 192 bases	501 182 bases	619 311 bases
Total len.	23 252 940 bases	23 254 481 bases	23 253 940 bases	23 303 015 bases	23 304 541 bases	23 254 621 bases
Gen. features	61 182	61 179	61 184	61 088	61 088	61 163
Mismatches	117 768	117 486	117 294	117 655	117 438	117 311
Fully unaligned	206 483 bases	164 906 bases	206 483 bases	424 247 bases	422 206 bases	150 553 bases

Sur cette même métrique, les assemblages obtenus avec WGST semblent faire encore mieux que la stratégie 02_SP_cor_BH (164 905 bases contre 150 553 bases pour WGST). Après renseignement, il s'est avéré que ce dernier a lui-même recours à SPAdes pour réaliser l'assemblage des génomes. La différence observée au sein de cette métrique peut dès lors s'expliquer par les réglages appliqués à SPAdes. En effet, cet outil possède une pléthore de réglages, pour la plupart configurés sur « détection automatique » lorsque l'outil est utilisé avec les réglages par défaut (taille des KMER à considérer, mode --careful activé ou non, limite de couverture, pour ne citer qu'eux). Lorsque ces paramètres sont configurés manuellement, la qualité de l'assemblage qui en résulte peut potentiellement être améliorée. Ceci nécessite néanmoins une longue et fastidieuse mise au point afin de déterminer l'impact sur l'assemblage final de chacun de ces paramètres, en vue de sélectionner la combinaison qui permet de maximiser la qualité des assemblages. Dans le cadre de ce travail, l'assemblage obtenu par SPAdes est suffisant pour mener les analyses bio-informatiques prévues en aval.

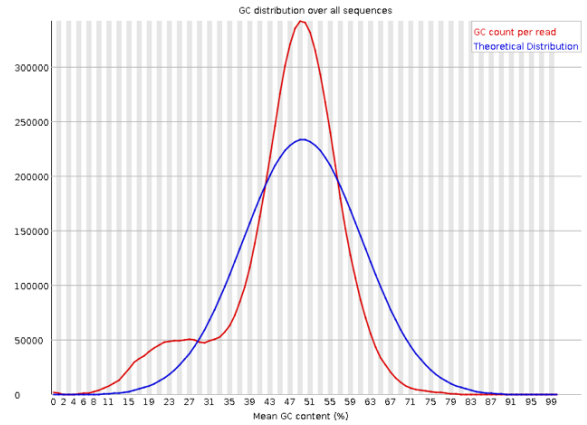


FIGURE 4.10. Distribution du %GC des *reads* pour la souche KE017

Le graphique est construit sur base de l'analyse de FastQC (***Andrews, 2010***). Une librairie correctement préparée devrait avoir une distribution Gaussienne du pourcentage en bases GC. Ici, un second pic (aux alentours de 23% GC) est présent, ce qui semble indiquer une légère contamination. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour confirmer ou infirmer celle-ci.

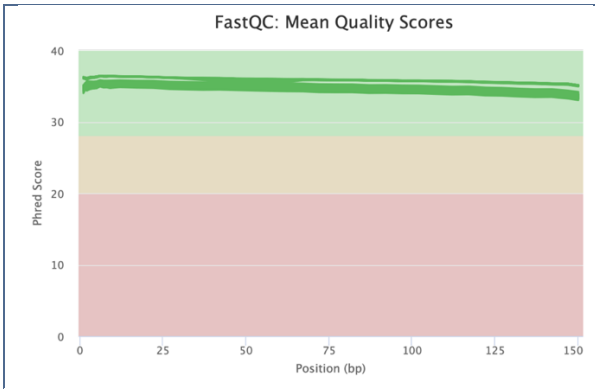


FIGURE 4.13. Évaluation du score de qualité par position

Le graphique est construit sur base de l'analyse de tous les fichiers fastq.gz par FastQC (***Andrews, 2010***) suivi d'une fusion de tous les rapports obtenus par MultiQC (***Ewels et al., 2016***). L'abscisse représente une position au sein du read tandis que l'ordonnée représente le score de qualité Phred (qui s'établit de 0 à 40).

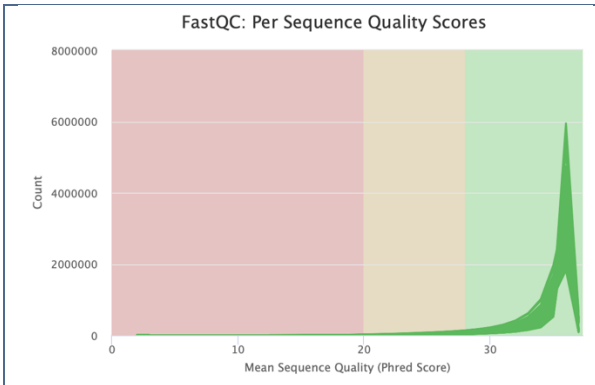


FIGURE 4.14. Évaluation du score de qualité moyen par *read*

Le graphique est construit sur base de l'analyse de tous les fichiers fastq.gz par FastQC (***Andrews, 2010***) suivi d'une fusion de tous les rapports obtenus par MultiQC (***Ewels et al., 2016***). L'abscisse représente le score de qualité Phred (qui s'établit de 0 à 40) tandis que l'ordonnée représente le nombre de *reads*.

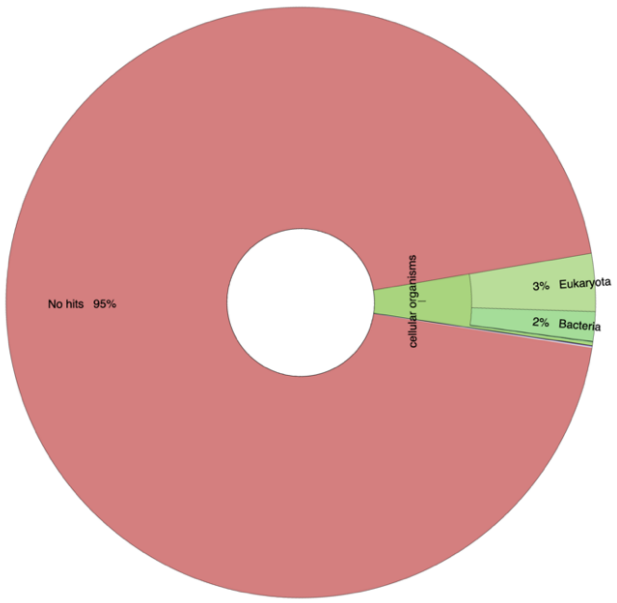


FIGURE 4.11. Analyse de contamination de la souche KE017 avec Kraken2

Le graphique est construit grâce au programme Krona sur base du rapport généré par l'outil de classification taxonomique Kraken2. Ce dernier utilise une DB afin d'y aligner les *reads* du génome étudié. Malheureusement, cette DB ne contient pas les séquences des champignons du genre *Trichophyton* à ce jour. Il est donc normal, dans une certaine mesure, que 95% des reads de la souche KE017 n'aient aucune correspondance au sein de la DB. Selon ces résultats, 3% des reads appartiennent à d'autres espèces eucaryotes tandis que 2% appartiennent à d'autres espèces bactériennes.

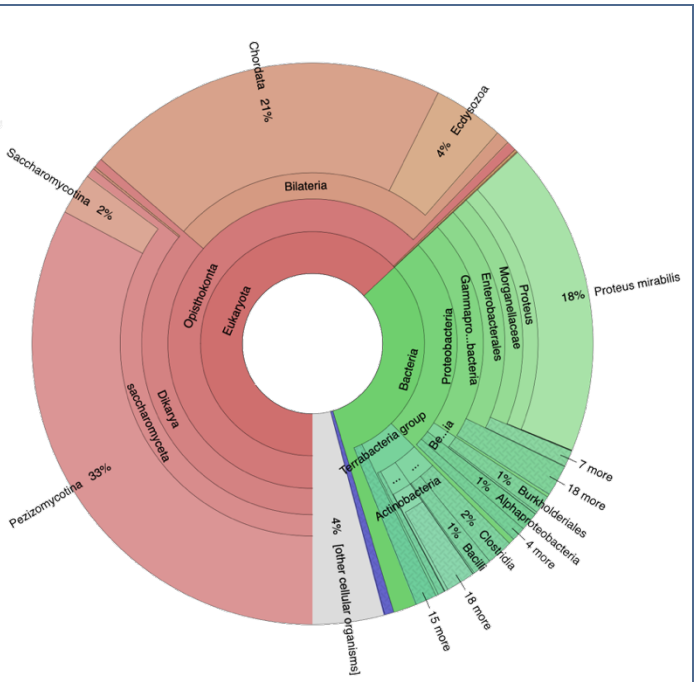


FIGURE 4.12. Détails du *cluster* de contamination de l'analyse Kraken2

Ce graphique détaille les espèces présentes dans les 5% de contaminants détectés par Kraken2. Il fait suite aux résultats de la ***FIGURE 4.11***

Les assemblages utilisés à cette fin sont ceux issus du programme WGST (et donc, assemblés grâce à SPAdes). Un critère d'exclusion a été mis en place à ce stade : il s'agit de la taille du génome assemblé. Ce paramètre permet, dans une certaine mesure, d'écarter les contaminations. Les espèces étudiées possèdent un génome dont la taille est située entre 20 et 25 mégabases. Un génome assemblé qui présente une taille sensiblement inférieure ou supérieure à ces valeurs sera donc considéré comme non-valable. C'est le cas de la souche KE074, dont le génome assemblé présentait une taille de 46 mégabases. L'analyse Kraken2 de cette souche n'a révélé aucune origine de contamination. De manière assez curieuse, l'extraction du segment ITS2 du génome assemblé suivie de son alignement au sein de la DB du WI a permis de confirmer l'identification de la souche : il s'agit bel et bien d'un dermatophyte appartenant au complexe *T. mentagrophytes/interdigitale*. Néanmoins, il a été décidé d'écarter cette souche des analyses bio-informatiques qui suivent étant donné la taille anormale de son génome. Des analyses plus poussées devront être menées afin de permettre d'identifier la source de la contamination.

4.8. Analyse des **marqueurs** moléculaires

L'analyse des marqueurs moléculaires (***FIGURE 4.15***) est réalisée grâce à WGST. Celle-ci permet la détection de 7 marqueurs, dont 5 métalloprotéases (MEP1 à MEP5), une subtilisine (SUB6) et la SQLE. Tandis que les 6 premiers marqueurs sont impliqués dans la virulence des dermatophytes, le dernier est à l'origine de l'émergence des phénomènes de résistance à la terbinafine. La majorité des souches analysées présentaient un profil identique du point de vue des 7 marqueurs analysés (***TABLEAU 4E***). Sur les 60 souches analysées, seules 8 souches ont montré des variations au niveau de la séquence SQLE. Parmi celles-ci, 2 souches présentent la mutation SQLE L393F, 6 souches présentent la mutation SQLE F397L. En ce qui concerne les métalloprotéases et subtilisines, 1 seule souche (KE060) présentait 2 marqueurs supplémentaires (marqueurs Mep1/Sub6) et à l'inverse, 1 souche (KE017) a été caractérisée par l'absence d'un marqueur présent dans le profil type, le marqueur Mep5 (***FIGURES 4.15 & 4.16***). De manière très intéressante, la souche KE060 qui présente un profil atypique (en termes de marqueurs analysés par rapport au reste des souches) avait été identifiée précédemment comme appartenant au genre *Nannizzia*. La présente analyse des marqueurs semble donc confirmer quelque peu cette identification.

Lien externe : **QR 16**

TABLEAU 4E. Profil majoritaire des souches de dermatophytes étudiées

Marqueur	Valeur
Mep1	✗
Mep2	✓
Mep3	✓
Mep4	✗
Mep5	✓
Sub6	✗
SQLE	WT

4.8.1. Analyse du gène de la squalène époxydase

Le logiciel WGST a permis de détecter une mutation de la SQLE au sein de 8 souches parmi les 60 étudiées (***TABLEAU 4F***). Cela étant dit, la concordance entre les résultats obtenus par la méthode de référence (microdilution en milieu liquide) et ceux obtenus par caractérisation du gène SQLE n'est pas systématiquement observée. Ainsi, la souche KE028 fait figure d'exception. Celle-ci fut caractérisée comme étant résistante tant par la méthode de *screening* que par la méthode de microdilution en milieu liquide. Néanmoins, la caractérisation du gène SQLE de cette souche n'a révélé la présence d'aucune des 4 mutations ciblées (***FIGURE 4.15***). Puisqu'il existe un risque que cette souche (et d'autres) présente(nt) en réalité une mutation non-ciblée par le programme WGST au sein du gène SQLE, une recherche manuelle (tBLASTn sur génome avec la séquence GenBank BAL48859.1) a été effectuée sur la totalité des souches étudiées (***FIGURE 4.17***). Ceci a révélé l'existence d'un site de polymorphisme en position 276 de la SQLE (***FIGURE 4.18***). A cette position, la lysine (K) de la séquence *wildtype* peut, selon la souche, être remplacée par une asparagine (N). Cette mutation est observée au sein de 22 génomes sur les 60 étudiés, y compris la souche KE028. Ceci représente une fréquence de 37%. A ce stade, l'identification exacte des souches n'est pas encore établie (elle le sera dans le point suivant). Néanmoins, lorsque les informations obtenues par l'identification sont regroupées avec celles obtenues par le séquençage du gène SQLE, il apparait que les 100% des 22 souches porteuses de la mutation K276N appartiennent à l'espèce *T. mentagrophytes stricto sensu*.

TABLEAU 4F. Concordance entre le *screening* et l'analyse génotypique par WGST

N° partiel	*Screening*	Microdilution	SQLE	Concordance
KE**028**	**Résistant**	**Résistant**	WT	✗
KE**035**	**Résistant**	**Sensible**	WT	✓
KE**059**	**Résistant**	**Résistant**	F397L	✓
KE**063** (IHEM 28378)	**Résistant**	**Résistant**	F397L	✓
KE**064** (IHEM 28379)	**Résistant**	**Résistant**	F397L	✓
KE**065** (IHEM 28380)	**Résistant**	**Résistant**	F397L	✓
KE**067** (IHEM 28384)	**Résistant**	**Résistant**	F397L	✓
KE**069**	**Résistant**	**Résistant**	L393F	✓
KE**070**	**Résistant**	**Résistant**	L393F	✓
KE**075**	**Résistant**	**Résistant**	F397L	✓

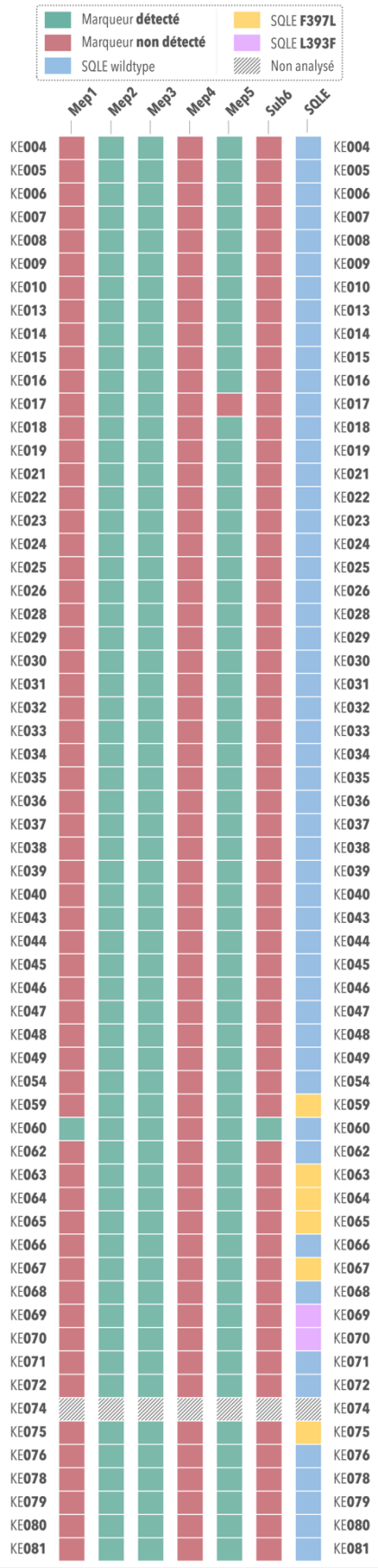


FIGURE 4.15. Analyse des marqueurs sur WGST

Chaque ligne représente un échantillon et chaque colonne un marqueur. Au total, 8 marqueurs sont analysés : les métalloprotéases MEP1 à MEP5, la subtilisine SUB6, le gène de la SQLE ainsi que transporteur TruMDR3. La souche KE074 n'a pu être analysée dû à un problème d'assemblage.

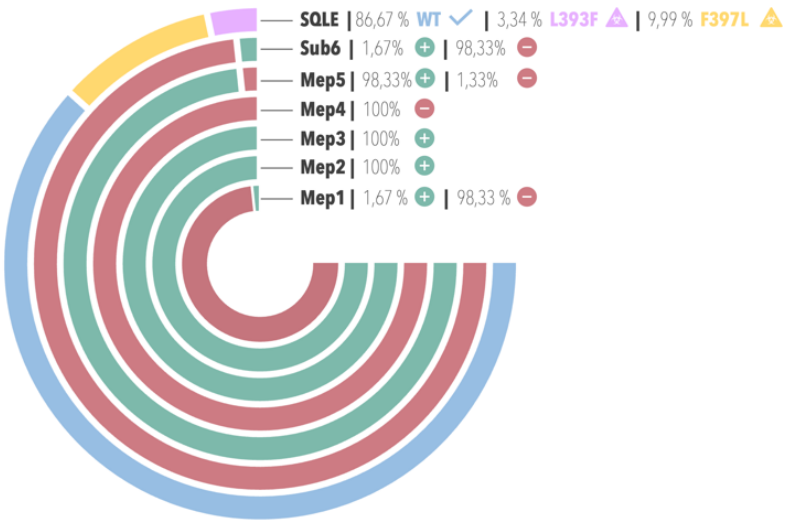


FIGURE 4.16. Distribution du profil moléculaire des souches analysées

La majorité des souches présentent un profil type (**TABLEAU 4E**). Cependant, 10 souches présentent des variations. C'est le cas des souches KE017, KE059, KE060, KE063, KE064, KE065, KE067, KE069, KE070 et KE075.

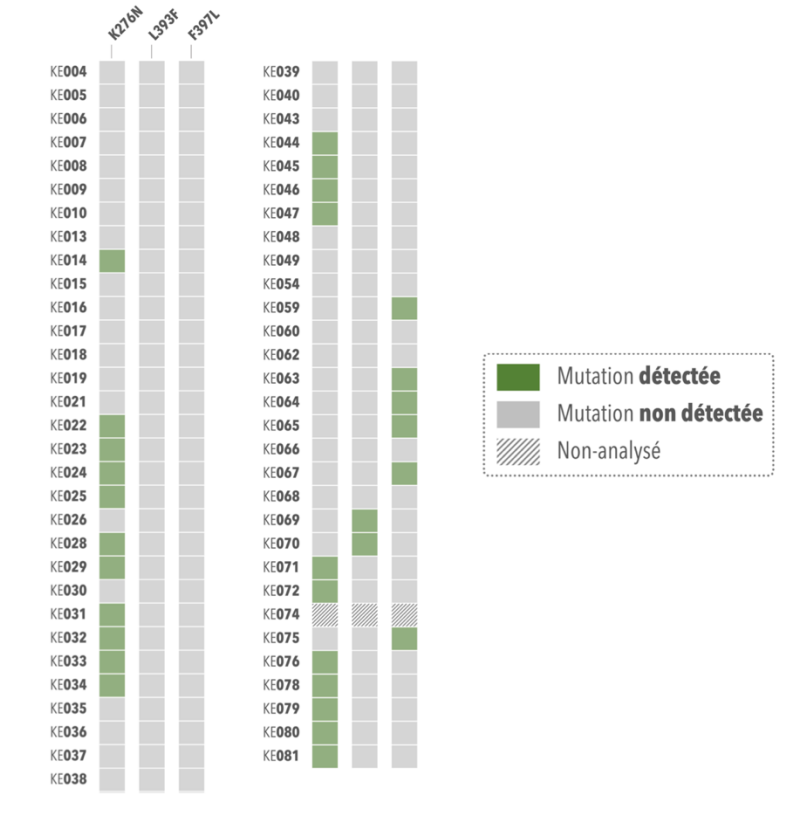


FIGURE 4.17. Analyse manuelle du gène SQLE par tBLASTn

3 mutations sont détectées par cette approche : K276N, L393F et F397L.

```
Query  241     DFPPILIYQIGEHETRILIDIPDNLPSASVANGGVKGHMRNVVLPSLPECIRPSFEAALE  300
               DFPPILIYQIGEHETRILIDIPDNLPSASVANGGV GHMRNVVLPSLPECIRPSFEAALE
Sbjct  180487  DFPPILIYQIGEHETRILIDIPDNLPSASVANGGVNGHMRNVVLPSLPECIRPSFEAALE  180308
```

FIGURE 4.18. Alignement des séquences SQLE *wildtype* et SQLE (KE028)

L'alignement révèle l'existence d'un polymorphisme d'acides aminés en position 276 de la séquence (encadré en rouge sur le schéma). Ce site n'étant pas ciblé par WGST, la mutation n'est détectée que par une analyse manuelle tBLASTn sur le génome de chaque souche.

Dans les faits, ce clade contient 25 souches, ce qui laisse 3 souches (KE017, KE030 et KE062) au sein desquelles le gène SQLE ne semble pas porter la mutation K276N. Concernant les mutations L393F et F397L, la recherche tBLASTn manuelle a donné des résultats identiques à ceux obtenus par WGST.

4.9. Classification des souches étudiées

Cette section combine plusieurs approches afin de discriminer au mieux les espèces phylogénétiquement proches du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. Sur les 10 approches étudiées, 2 se basent sur le génome entier tandis que les 8 restantes sont basées sur de courtes séquences d'ADN ciblées. Un tableau récapitulatif regroupant les résultats obtenus par les 10 approches testées se trouve à la fin de cette section (***TABLEAU 4G***).

4.9.1. Approche phylogénomique par construction de dendrogramme

Première approche basée sur l'étude du génome entier, cette méthode (appelée PHYL | WGST dans la suite de ce travail) consiste à créer un dendrogramme grâce à l'outil WGST après assemblage des génomes. Le résultat montre 3 clades distincts formés par chacune des espèces qui composent le complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. La souche KE060, dont l'identification précédente fut non-concluante, apparait dorénavant clairement en dehors des 3 clades précités. Ceci confirme l'hypothèse selon laquelle cette souche appartient en réalité à l'espèce *N. persicolor*. En termes de proportions, cette méthode identifie 41,67% de *T. mentagrophytes*, 36,67% de *T. interdigitale*, 20% de *T. indotineae* et 1,66% de *N. persicolor* (***FIGURE 4.19***). Pour ce qui est de l'espèce *T. indotineae*, il existe bel et bien un génome de référence à ce jour (GenBank GCA_023065905.1). Cependant, ce dernier est très récent puisqu'il a été proposé le 20 avril 2022. Le logiciel WGST n'ayant pas été mis à jour depuis cette date, les dendrogrammes qu'il propose ne contiennent pas de génome de référence pour cette espèce. Cette limitation, qui sera sans doute corrigée à l'avenir par une mise à jour du programme, peut également l'être à l'heure actuelle dans la mesure où les souches IHEM utilisées peuvent faire office de génome de référence. Initialement désignées sous l'appellation « *T. mentagrophytes* ITS type VIII », ces souches ont depuis été reclassées et font dorénavant partie de l'espèce *T. indotineae* (*BCCM, 2022*). L'un des objectifs de cette étude a été de déterminer si ces souches sont plutôt proches de l'espèce *T. mentagrophytes* ou à l'inverse, de l'espèce *T. interdigitale*. L'analyse du dendrogramme généré (***FIGURE 4.20***) apporte une réponse à cette question. Il apparait ainsi que cette espèce récemment définie se rapproche plus de l'espèce *T. interdigitale* que de l'espèce *T. mentagrophytes*. L'identification obtenue grâce à cette approche fera office de référence pour toutes les approches qui suivent. Cette répartition est assez éloignée de celle qui était initialement attendue. Néanmoins, ceci est expliqué par la nature des caractérisations effectuées.

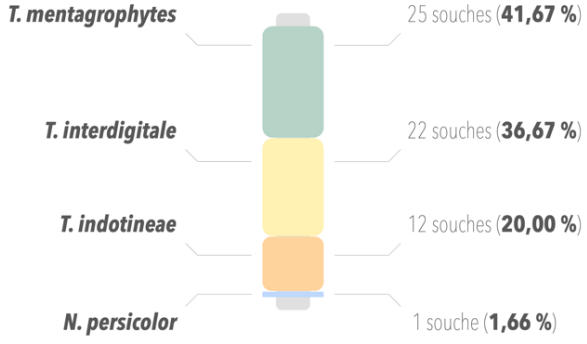


FIGURE 4.19. Nouvelle distribution de l'échantillon étudié

Cette distribution résulte de la caractérisation par l'approche PHYL | WGST. Cette caractérisation fait apparaître 2 nouvelles espèces dans l'échantillon (qui ne devait être initialement constitué que de 2 espèces : *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale*).

Là où la répartition obtenue par l'approche PHYL | WGST est basée sur l'étude du génome dans son intégralité, la répartition attendue est basée en majorité sur une identification microscopique des souches sélectionnées (***FIGURE 4.01***). Or dans la mesure où les espèces du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* sont proches, il peut s'avérer délicat de distinguer ces dernières sur base d'une observation au microscope. Le présent résultat permet donc de souligner le manque de spécificité de cette méthodologie d'identification. Par ailleurs, il est intéressant de noter que tous les dermatophytes ayant été caractérisés comme étant résistants à la terbinafine se classent dans le clade des *T. indotineae* (ces derniers sont mis en évidence en rouge dans la ***FIGURE 4.20***). Autre fait intéressant : ce clade, bien que constitué majoritairement (67%) de souches résistantes à la terbinafine, contient des souches qui y sont sensibles : c'est le cas des souches KE066, KE040, KE021 et KE068. Ceci prouve que les dermatophytes de l'espèce *T. indotineae* présentent majoritairement (mais pas exclusivement) un profil de résistance à la terbinafine. Par la suite, une analyse de chaque clade en regard de l'origine du prélèvement est effectuée. Ceci révèle que pour le clade *T. mentagrophytes*, la majorité des souches sont prélevées sur une peau (***FIGURE 4.21***) tandis que pour le clade *T. interdigitale*, la majorité des souches sont prélevées sur un ongle (***FIGURE 4.22***). Une autre observation peut être faite : ni l'espèce *T. mentagrophytes* ni l'espèce *T. indotineae* ne semblent donner lieu à une onychomycose. Par ailleurs, l'espèce *T. interdigitale* ne semble pas donner lieu à une infection du cuir chevelu. Pour ce qui est du clade *T. indotineae*, 84% des souches ont été prélevée sur une peau (***FIGURE 4.23***). Ceci confirme l'existence d'une tendance selon l'origine du prélèvement, bien que ce fait soit à considérer avec précautions. En effet, la faible taille de l'échantillon étudié (n = 60) ne permet pas de tirer des conclusions qu'il est possible d'inférer à la population entière des dermatophytes. L'analyse du génome reste la méthode la plus efficace pour la distinction des espèces.

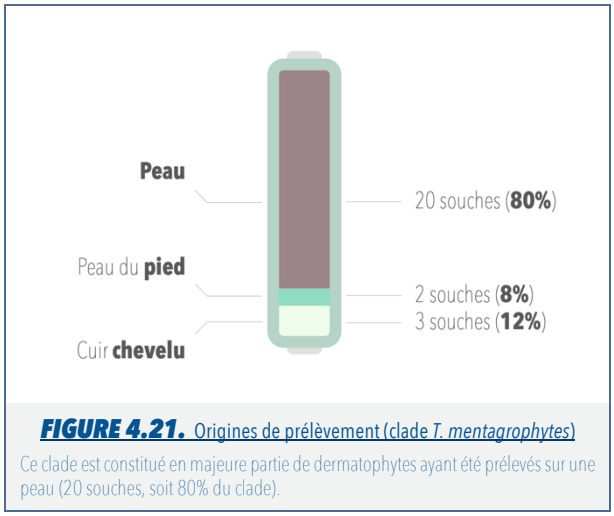


FIGURE 4.21. Origines de prélèvement (clade *T. mentagrophytes*)

Ce clade est constitué en majeure partie de dermatophytes ayant été prélevés sur une peau (20 souches, soit 80% du clade).

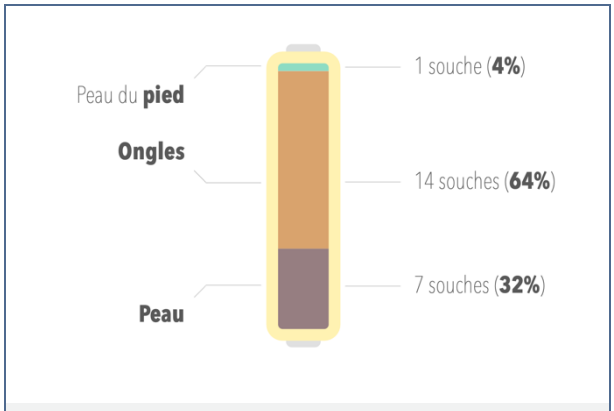


FIGURE 4.22. Origines de prélèvement (clade *T. interdigitale*)

Ce clade est constitué en majeure partie de dermatophytes ayant été prélevés sur un ongle (14 souches, soit 64% du clade).

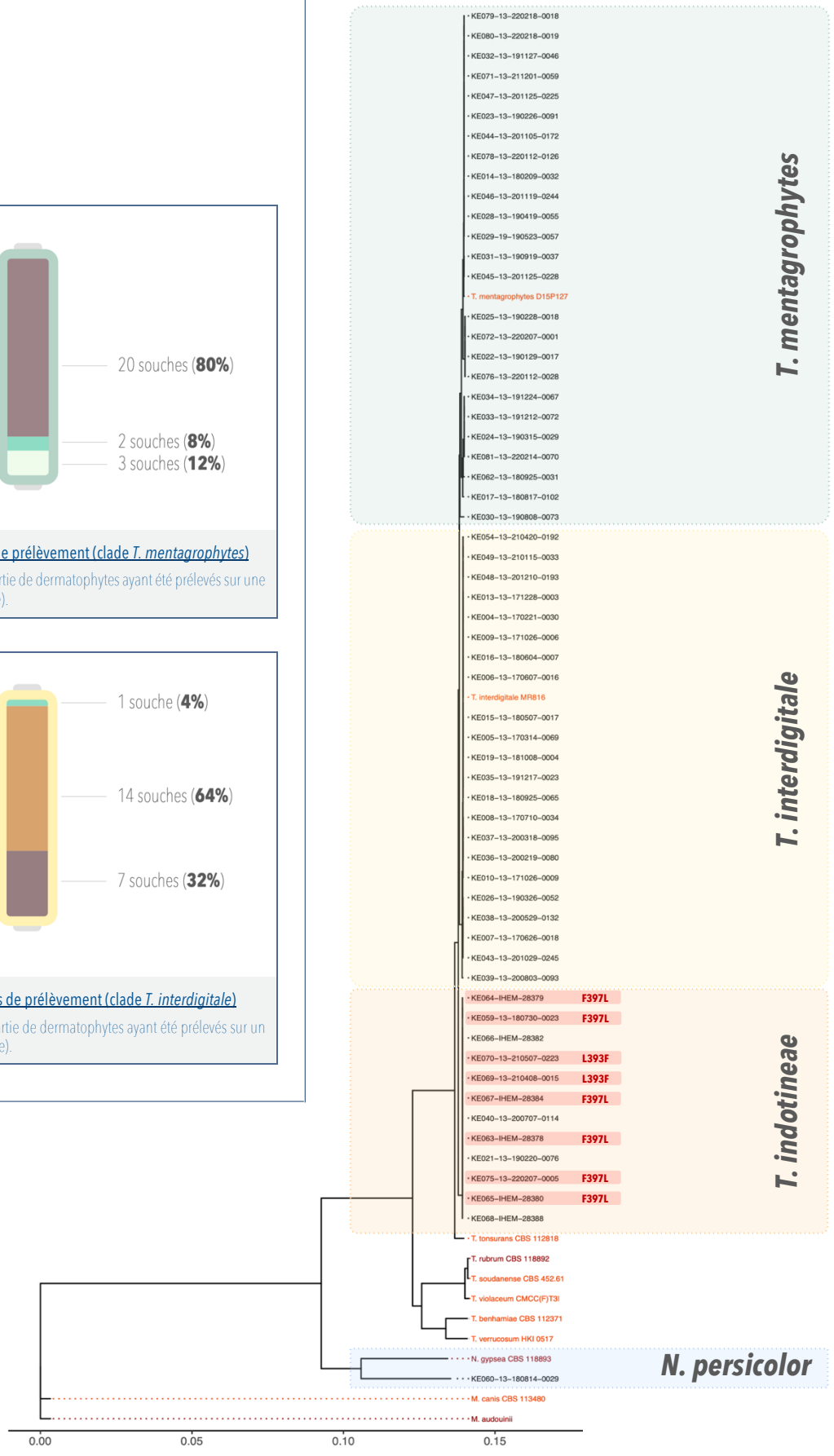


FIGURE 4.20. Classification des dermatophytes par l'approche PHYL | WGST

Cette approche consiste à créer un dendrogramme qui inclus 11 génomes de référence à l'heure actuelle. L'identification des souches est obtenue selon le clade où les souches se classent. Les souches résistantes à la terbinafine sont marquées en rouge. La mutation détectée dans le gène SQLE est mentionnée à droite du marquage.

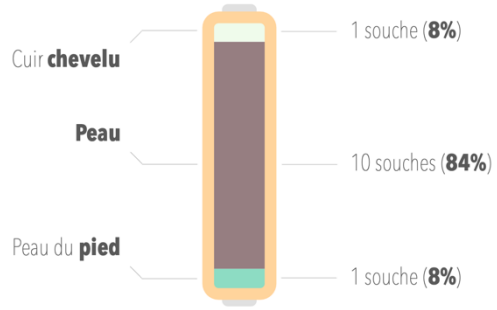


FIGURE 4.23. Origines du prélèvement (clade *T. indotineae*)

Ce clade est constitué en majeure partie de dermatophytes ayant été prélevés sur une peau (10 souches, soit 84%).

Par ailleurs, il est intéressant de noter que tous les dermatophytes ayant été caractérisés comme étant résistants à la terbinafine se classent dans le clade des *T. indotineae* (ces derniers sont mis en évidence par une étoile rouge dans la ***FIGURE 4.19***). Autre fait intéressant : ce clade, bien que constitué majoritairement (67%) de souches résistantes à la terbinafine, contient des souches qui y sont sensibles : c'est le cas des souches KE066, KE040, KE021 et KE068. Ceci prouve que les dermatophytes de l'espèce *T. indotineae* présentent majoritairement (mais pas exclusivement) un profil de résistance à la terbinafine. Par la suite, une analyse de chaque clade en regard de l'origine du prélèvement est effectuée. Ceci révèle que pour le clade *T. mentagrophytes*, la majorité des souches sont prélevées sur une peau (***FIGURE 4.21***) tandis que pour le clade *T. interdigitale*, la majorité des souches sont prélevées sur un ongle (***FIGURE 4.22***). Une autre observation peut être faite : ni l'espèce *T. mentagrophytes* ni l'espèce *T. indotineae* ne semblent donner lieu à une onychomycose. Par ailleurs, l'espèce *T. interdigitale* ne semble pas donner lieu à une infection du cuir chevelu. Pour ce qui est du clade *T. indotineae*, 84% des souches ont été prélevée sur une peau (***FIGURE 4.23***). Ceci confirme l'existence d'une tendance selon l'origine du prélèvement, bien que ce fait soit à considérer avec précautions. En effet, la faible taille de l'échantillon étudié (n = 60) ne permet pas de tirer des conclusions qu'il est possible d'inférer à la population entière des dermatophytes. L'analyse du génome reste la méthode la plus efficace pour la distinction des espèces.

4.9.2. Approche phylogénomique par mesure d'*ANI*

La seconde approche (appelée PHYL | ANI dans la suite de ce travail) est également basée sur l'étude du génome entier. Cependant, contrairement à la première, celle-ci implique la détermination d'une métrique chiffrée (l'ANI), ne laissant ainsi que peu de place à l'interprétation subjective quant à l'identification d'une souche. Les génomes de référence utilisés pour la comparaison sont identiques à ceux qu'utilise WGST pour créer le dendrogramme au point précédent, exception faite pour le génome de *T. indotineae* (TIMM20114) qui a été rajouté à cette analyse. Lorsqu'elles sont comparées aux identifications obtenues par l'approche PHYL | WGST, les identifications obtenues par l'approche PHYL | ANI sont identiques à 98,33% (***FIGURES 4.24 & 4.25***). La performance pour cette méthode se rapproche du maximum. A l'inverse des 2 premières, les 8 approches suivantes sont basées sur l'analyse d'un seul gène (ITS1, ITS2 ou TEF1a). Le but visé est la détermination de la (des) combinaison(s) séquence/méthode qui permet(tent) d'identifier les souches avec une efficacité qui se rapproche au mieux des méthodes basées sur l'étude du génome entier. Pour mieux les visualiser, les séquences ITS1 et ITS2 sont alignées entre-elles grâce à l'algorithme *MAFFT* après une extraction par ITSx. En procédant ainsi, l'alignement fait apparaître des séquences fortement conservées au sein du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* (surtout pour la séquence ITS2). Néanmoins, au sein de la séquence ITS1, une observation peut être faite à ce stade. Un site semble spécifique de l'espèce *T. indotineae* : il s'agit du nucléotide en position 127 (***FIGURE 4.26***). Un gros plan sur cette zone montre, génomes de références à l'appui, que les souches appartenant à l'espèce *T. indotineae* ont une thymine à cette position tandis que les souches appartenant à l'espèce *T. mentagrophytes* ont une cytosine à la même position (***FIGURE 4.27***). Le même constat peut être fait pour la séquence ITS2, plus précisément au site 51 (***FIGURES 4.28 & 4.29***). Sur les 12 dermatophytes identifiés comme appartenant à l'espèce *T. indotineae* par l'approche PHYL | WGST, 100% d'entre eux possèdent ce profil. Ce constat peut amener à penser qu'il sera délicat de discriminer les espèces *T. mentagrophytes/interdigitale* entre elles sur base des séquences ITS1/ITS2. A l'inverse, étant donné la nature du nucléotide présent en position 127 de l'ITS1 et/ou 51 de l'ITS2, la discrimination de l'espèce *T. indotineae* du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* devrait être efficace lorsque l'identification est basée sur l'un ou l'autre de ces segments d'ADN. Les 8 approches qui suivent permettront d'infirmer/confirmer cette prédiction.

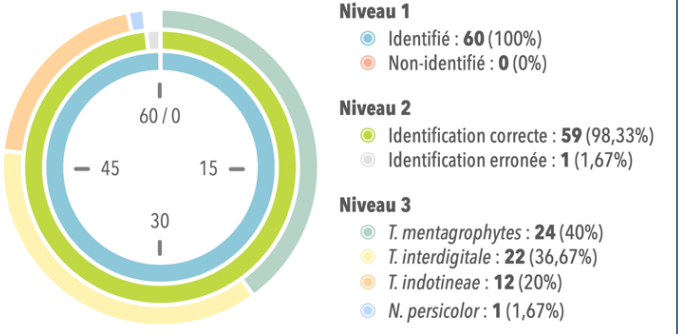
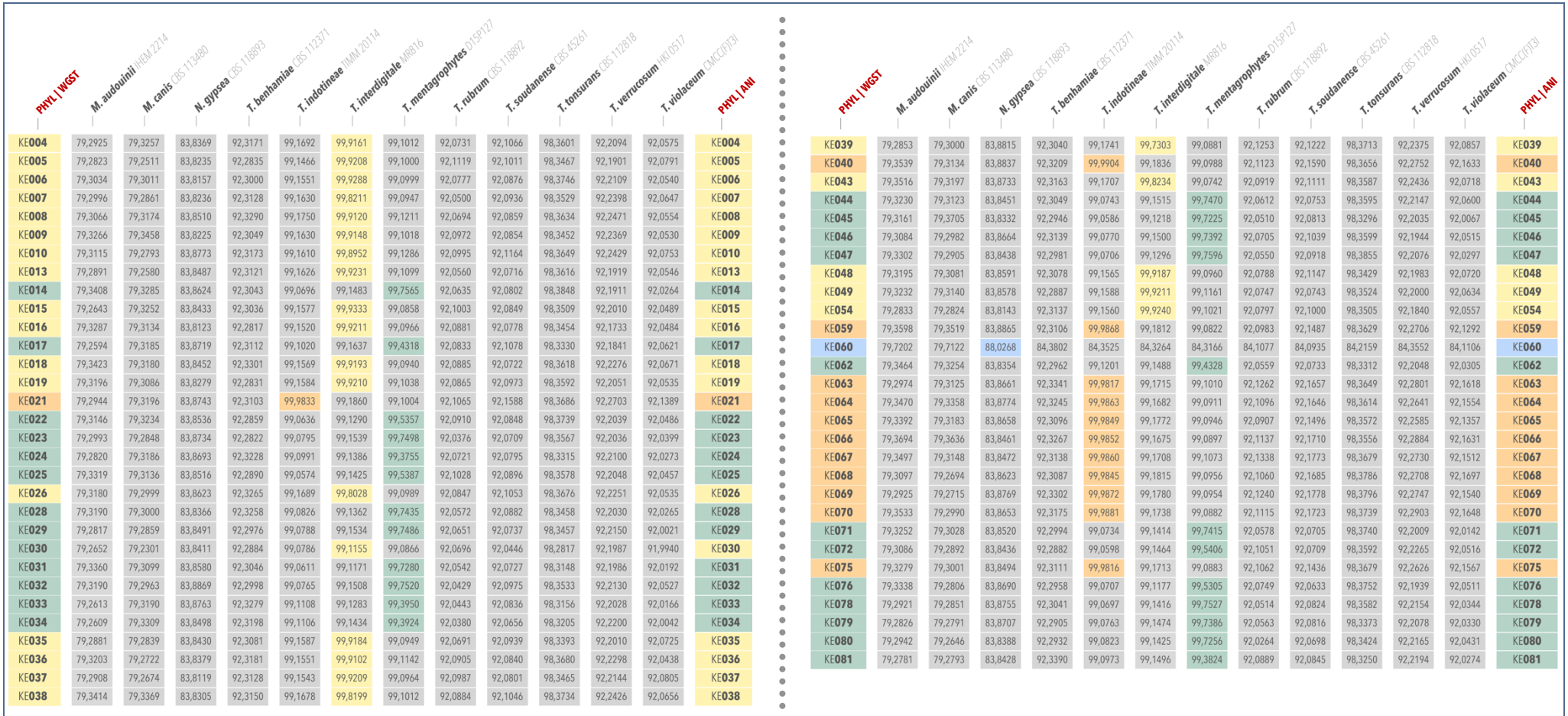


FIGURE 4.24. Performance de l'ID par l'approche PHYL | ANI

Sur les 60 souches étudiées, toutes les identifications obtenues ont été retenues. Parmi celles-ci, 59 concordent avec celles obtenues par l'approche PHYL | WGST. La performance de la méthode (à l'échelle de tout l'échantillon) est donc de 98,33%.

Lien externe : **QR 17**

T. mentagrophytes
T. interdigitale
T. indotineae
N. persicolor



PHYL | WGST	*M. audouinii* IHEM 2214	*M. canis* CBS 113480	*N. gypsea* CBS 118893	*T. benhamiae* CBS 112371	*T. indotineae* TIMM 20114	*T. interdigitale* MR816	*T. mentagrophytes* D15P127	*T. rubrum* CBS 118892	*T. soudanense* CBS 45261	*T. tonsurans* CBS 112818	*T. verrucosum* HKI 0517	*T. violaceum* CMCCF3I	PHYL | ANI
KE004	79,2925	79,3257	83,8369	92,3171	99,1692	99,9161	99,1012	92,0731	92,1066	98,3601	92,2094	92,0575	KE004
KE005	79,2823	79,2511	83,8235	92,2835	99,1466	99,9208	99,1000	92,1119	92,1011	98,3467	92,1901	92,0791	KE005
KE006	79,3034	79,3011	83,8157	92,3000	99,1551	99,9288	99,0999	92,0777	92,0876	98,3746	92,2109	92,0540	KE006
KE007	79,2996	79,2861	83,8236	92,3128	99,1630	99,8211	99,0947	92,0500	92,0936	98,3529	92,2398	92,0647	KE007
KE008	79,3066	79,3174	83,8510	92,3290	99,1750	99,9120	99,1211	92,0694	92,0859	98,3634	92,2471	92,0554	KE008
KE009	79,3266	79,3458	83,8225	92,3049	99,1630	99,9148	99,1018	92,0972	92,0854	98,3452	92,2369	92,0530	KE009
KE010	79,3115	79,2793	83,8773	92,3173	99,1610	99,8952	99,1286	92,0995	92,1164	98,3649	92,2429	92,0753	KE010
KE013	79,2891	79,2580	83,8487	92,3121	99,1626	99,9231	99,1099	92,0560	92,0716	98,3616	92,1919	92,0546	KE013
KE014	79,3408	79,3285	83,8624	92,3043	99,0696	99,1483	99,7565	92,0635	92,0802	98,3848	92,1911	92,0264	KE014
KE015	79,2643	79,3252	83,8433	92,3036	99,1577	99,9333	99,0858	92,1003	92,0849	98,3509	92,2010	92,0489	KE015
KE016	79,3287	79,3134	83,8123	92,2817	99,1520	99,9211	99,0966	92,0881	92,0778	98,3454	92,1733	92,0484	KE016
KE017	79,2594	79,3185	83,8719	92,3112	99,1020	99,1637	99,4318	92,0833	92,1078	98,3330	92,1841	92,0621	KE017
KE018	79,3423	79,3180	83,8452	92,3301	99,1569	99,9193	99,0940	92,0885	92,0722	98,3618	92,2276	92,0671	KE018
KE019	79,3196	79,3086	83,8279	92,2831	99,1584	99,9210	99,1038	92,0865	92,0973	98,3592	92,2051	92,0535	KE019
KE021	79,2944	79,3196	83,8743	92,3103	99,9833	99,1860	99,1004	92,1065	92,1588	98,3686	92,2703	92,1389	KE021
KE022	79,3146	79,3234	83,8536	92,2859	99,0636	99,1290	99,5357	92,0910	92,0848	98,3739	92,2039	92,0486	KE022
KE023	79,2993	79,2848	83,8734	92,2822	99,0795	99,1539	99,7498	92,0376	92,0709	98,3567	92,2036	92,0399	KE023
KE024	79,2820	79,3186	83,8693	92,3228	99,0991	99,1386	99,3755	92,0721	92,0795	98,3315	92,2100	92,0273	KE024
KE025	79,3319	79,3136	83,8516	92,2890	99,0574	99,1425	99,5387	92,1028	92,0896	98,3578	92,2048	92,0457	KE025
KE026	79,3180	79,2999	83,8623	92,3265	99,1689	99,8028	99,0989	92,0847	92,1053	98,3676	92,2251	92,0535	KE026
KE028	79,3190	79,3000	83,8366	92,3258	99,0826	99,1362	99,7435	92,0572	92,0882	98,3458	92,2030	92,0265	KE028
KE029	79,2817	79,2859	83,8491	92,2976	99,0788	99,1534	99,7486	92,0651	92,0737	98,3457	92,2150	92,0021	KE029
KE030	79,2652	79,2301	83,8411	92,2884	99,0786	99,1155	99,0866	92,0696	92,0446	98,2817	92,1987	91,9940	KE030
KE031	79,3360	79,3099	83,8580	92,3046	99,0611	99,1171	99,7280	92,0542	92,0727	98,3148	92,1986	92,0192	KE031
KE032	79,3190	79,2963	83,8869	92,2998	99,0765	99,1508	99,7520	92,0429	92,0975	98,3533	92,2130	92,0527	KE032
KE033	79,2613	79,3190	83,8763	92,3279	99,1108	99,1283	99,3950	92,0443	92,0836	98,3156	92,2028	92,0166	KE033
KE034	79,2609	79,3309	83,8498	92,3198	99,1106	99,1434	99,3924	92,0380	92,0656	98,3205	92,2200	92,0042	KE034
KE035	79,2881	79,2839	83,8430	92,3081	99,1587	99,9184	99,0949	92,0691	92,0939	98,3393	92,2010	92,0725	KE035
KE036	79,3203	79,2722	83,8379	92,3181	99,1551	99,9102	99,1142	92,0905	92,0840	98,3680	92,2298	92,0438	KE036
KE037	79,2908	79,2674	83,8119	92,3128	99,1543	99,9209	99,0964	92,0987	92,0801	98,3465	92,2144	92,0805	KE037
KE038	79,3414	79,3369	83,8305	92,3150	99,1678	99,8199	99,1012	92,0884	92,1046	98,3734	92,2426	92,0656	KE038

PHYL | WGST	*M. audouinii* IHEM 2214	*M. canis* CBS 113480	*N. gypsea* CBS 118893	*T. benhamiae* CBS 112371	*T. indotineae* TIMM 20114	*T. interdigitale* MR816	*T. mentagrophytes* D15P127	*T. rubrum* CBS 118892	*T. soudanense* CBS 45261	*T. tonsurans* CBS 112818	*T. verrucosum* HKI 0517	*T. violaceum* CMCCF3I	PHYL | ANI
KE039	79,2853	79,3000	83,8815	92,3040	99,1741	99,7303	99,0881	92,1253	92,1222	98,3713	92,2375	92,0857	KE039
KE040	79,3539	79,3134	83,8837	92,3209	99,9904	99,1836	99,0988	92,1123	92,1590	98,3656	92,2752	92,1633	KE040
KE043	79,3516	79,3197	83,8733	92,3163	99,1707	99,8234	99,0742	92,0919	92,1111	98,3587	92,2436	92,0718	KE043
KE044	79,3230	79,3123	83,8451	92,3049	99,0743	99,1515	99,7470	92,0612	92,0753	98,3595	92,2147	92,0600	KE044
KE045	79,3161	79,3705	83,8332	92,2946	99,0586	99,1218	99,7225	92,0510	92,0813	98,3296	92,2035	92,0067	KE045
KE046	79,3084	79,2982	83,8664	92,3139	99,0770	99,1500	99,7392	92,0705	92,1039	98,3599	92,1944	92,0515	KE046
KE047	79,3302	79,2905	83,8438	92,2981	99,0706	99,1296	99,7596	92,0550	92,0918	98,3855	92,2076	92,0297	KE047
KE048	79,3195	79,3081	83,8591	92,3078	99,1565	99,9187	99,0960	92,0788	92,1147	98,3429	92,1983	92,0720	KE048
KE049	79,3232	79,3140	83,8578	92,2887	99,1588	99,9211	99,1161	92,0747	92,0743	98,3524	92,2000	92,0634	KE049
KE054	79,2833	79,2824	83,8143	92,3137	99,1560	99,9240	99,1021	92,0797	92,1000	98,3505	92,1840	92,0557	KE054
KE059	79,3598	79,3519	83,8865	92,3106	99,9868	99,1812	99,0822	92,0983	92,1487	98,3629	92,2706	92,1292	KE059
KE060	79,7202	79,7122	88,0268	84,3802	84,3525	84,3264	84,3166	84,1077	84,0935	84,2159	84,3552	84,1106	KE060
KE062	79,3464	79,3254	83,8354	92,2962	99,1201	99,1488	99,4328	92,0559	92,0733	98,3312	92,2048	92,0305	KE062
KE063	79,2974	79,3125	83,8661	92,3341	99,9817	99,1715	99,1010	92,1262	92,1657	98,3649	92,2801	92,1618	KE063
KE064	79,3470	79,3358	83,8774	92,3245	99,9863	99,1682	99,0911	92,1096	92,1646	98,3614	92,2641	92,1554	KE064
KE065	79,3392	79,3183	83,8658	92,3096	99,9849	99,1772	99,0946	92,0907	92,1496	98,3572	92,2585	92,1357	KE065
KE066	79,3694	79,3636	83,8461	92,3267	99,9852	99,1675	99,0897	92,1137	92,1710	98,3556	92,2884	92,1631	KE066
KE067	79,3497	79,3148	83,8472	92,3138	99,9860	99,1708	99,1073	92,1338	92,1773	98,3679	92,2730	92,1512	KE067
KE068	79,3097	79,2694	83,8623	92,3087	99,9845	99,1815	99,0956	92,1060	92,1685	98,3786	92,2708	92,1697	KE068
KE069	79,2925	79,2715	83,8769	92,3302	99,9872	99,1780	99,0954	92,1240	92,1778	98,3796	92,2747	92,1540	KE069
KE070	79,3533	79,2990	83,8653	92,3175	99,9881	99,1738	99,0882	92,1115	92,1723	98,3739	92,2903	92,1648	KE070
KE071	79,3252	79,3028	83,8520	92,2994	99,0734	99,1414	99,7415	92,0578	92,0705	98,3740	92,2009	92,0142	KE071
KE072	79,3086	79,2892	83,8436	92,2882	99,0598	99,1464	99,5406	92,1051	92,0709	98,3592	92,2265	92,0516	KE072
KE075	79,3279	79,3001	83,8494	92,3111	99,9816	99,1713	99,0883	92,1062	92,1436	98,3679	92,2626	92,1567	KE075
KE076	79,3338	79,2806	83,8690	92,2958	99,0707	99,1177	99,5305	92,0749	92,0633	98,3752	92,1939	92,0511	KE076
KE078	79,2921	79,2851	83,8755	92,3041	99,0697	99,1416	99,7527	92,0514	92,0824	98,3582	92,2154	92,0344	KE078
KE079	79,2826	79,2791	83,8707	92,2905	99,0763	99,1474	99,7386	92,0563	92,0816	98,3373	92,2078	92,0330	KE079
KE080	79,2942	79,2646	83,8388	92,2932	99,0823	99,1425	99,7256	92,0264	92,0698	98,3424	92,2165	92,0431	KE080
KE081	79,2781	79,2793	83,8428	92,3390	99,0973	99,1496	99,3824	92,0889	92,0845	98,3250	92,2194	92,0274	KE081

FIGURE 4.25. Classification des dermatophytes par l'approche PHYL | ANI

Chaque ligne représente une souche de dermatophyte. Le numéro partiel de gauche est surligné selon l'identification obtenue avec l'approche PHYL | WGST tandis que celui de droite correspond à l'identification obtenue avec l'approche PHYL | ANI. Pour chaque souche, le génome a été comparé au génome de référence de 12 espèces grâce à fastANI : *M. audouinii* (IHEM 2214), *M. canis* (CBS 113480), *N. gypsea* (CBS 118893), *T. benhamiae* (CBS 112371), *T. indotineae* (TIMM 20114), *T. interdigitale* (MR816), *T. mentagrophytes* (D15P127), *T. rubrum* (CBS 118892), *T. soudanense* (CBS 4561), *T. tonsurans* (CBS 112818), *T. verrucosum* (HKI 0517) et *T. violaceum* (CMCCF3I). La métrique qui résulte de cette comparaison est le pourcentage d'identité nucléotidique (*ANI*). Plus cette valeur est élevée, plus le génome étudié est proche du génome ayant servi de référence pour le test.

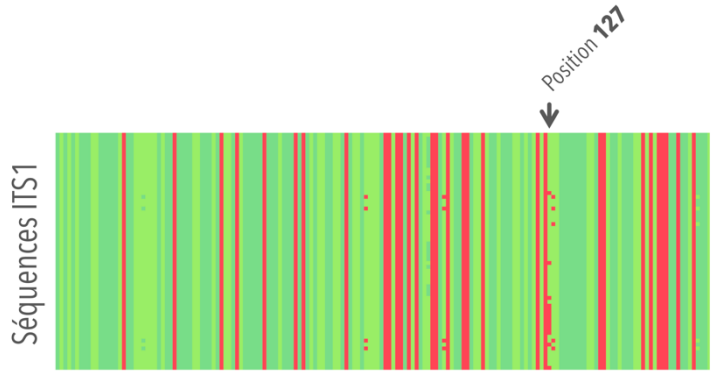


FIGURE 4.26. Alignement multiple des séquences ITS1 des dermatophytes étudiés

L'alignement fait apparaître un site polymorphique en position 51 de l'alignement des séquences ITS2. A ce stade, une observation préliminaire peut être effectuée : la nature du nucléotide présent à cette position semble conditionner l'identification de l'espèce. Le reste de la séquence ITS2 est quant à lui hautement conservé entre les deux espèces et ne permet pas de distinguer ces deux dernières sur base de ce paramètre.

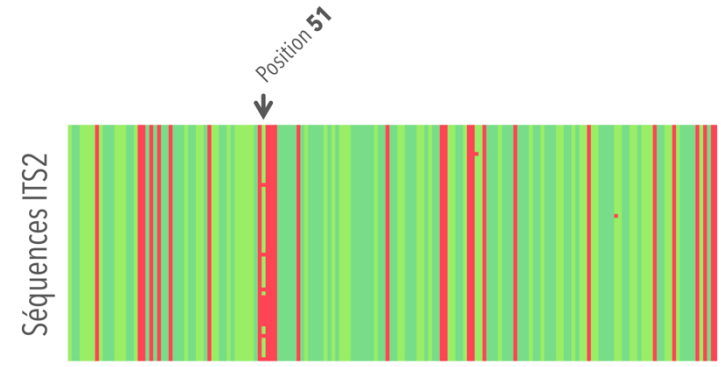


FIGURE 4.28. Alignement multiple des séquences ITS2 des dermatophytes étudiés

L'alignement fait apparaître un site polymorphique en position 51 de l'alignement des séquences ITS2. A ce stade, une observation préliminaire peut être effectuée : la nature du nucléotide présent à cette position semble conditionner l'identification de l'espèce. Le reste de la séquence ITS2 est quant à lui hautement conservé entre les deux espèces et ne permet pas de distinguer ces deux dernières sur base de ce paramètre.

4.9.3. Approche phylogénétique : O1 | ITS1 | WI

Première approche basée sur l'étude d'un seul gène, cette méthode consiste à extraire la séquence ITS1 du génome assemblé et à identifier l'espèce à laquelle cette séquence appartient grâce à un alignement (par BLASTn) au sein de la DB du WI. Le résultat est considéré fiable si la DB identifie 3 fois la même espèce avec un score de similarité supérieur à 95%. Si ces conditions ne sont pas remplies, l'identification obtenue n'est pas retenue. Pour la séquence ITS1 alignée au sein de la DB du WI, l'identification n'a été retenue que pour 38 souches sur les 60 analysées (***FIGURE 4.30***). L'identification obtenue pour les 22 souches restantes ne remplit pas les critères mis en place pour la considération du résultat (3 fois la même espèce et ce, avec un seuil de similarité supérieur à 95%). Parmi ces 38 souches identifiées par cette approche, 14 identifications ne correspondent pas à ce qui est attendu lorsque le résultat est comparé au dendrogramme généré par l'approche PHYL | WGST. La performance pour cette approche est sensiblement inférieure à celle obtenue par l'approche PHYL | ANI (***FIGURE 4.31***). Très efficace pour l'identification de l'espèce *T. interdigitale* (l'approche identifie 19 des 22 dermatophytes de cette espèce présents dans l'échantillon étudié), cette méthode montre des lacunes pour l'identification des 2 autres espèces du complexe (*T. indotineae* et *T. mentagrophytes)*.

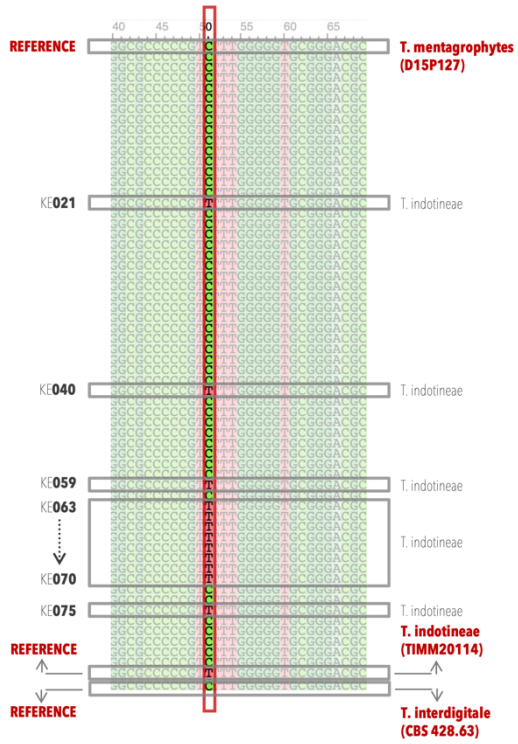


FIGURE 4.27. Gros plan sur la position 127 des séquences ITS1

Cette figure fait suite à la figure précédente. Ce site semble varier selon de l'espèce identifiée. Ainsi, sur les 12 souches de *T. indotineae* que compte l'échantillon, 12 d'entre eux possèdent une thymine en position 127 tandis que les espèces *T. mentagrophytes/interdigitale* possèdent une cytosine à la même localisation.

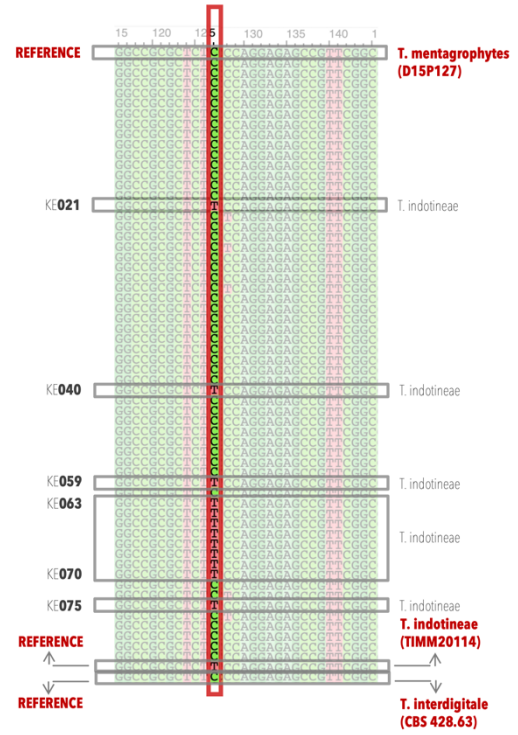


FIGURE 4.29. Gros plan sur la position 51 des séquences ITS2

Cette figure fait suite à la figure précédente. Ce site semble varier selon de l'espèce identifiée. Ainsi, sur les 12 souches de *T. indotineae* que compte l'échantillon, 12 d'entre eux possèdent une thymine en position 51 tandis que les espèces *T. mentagrophytes/interdigitale* possèdent une cytosine à la même localisation.

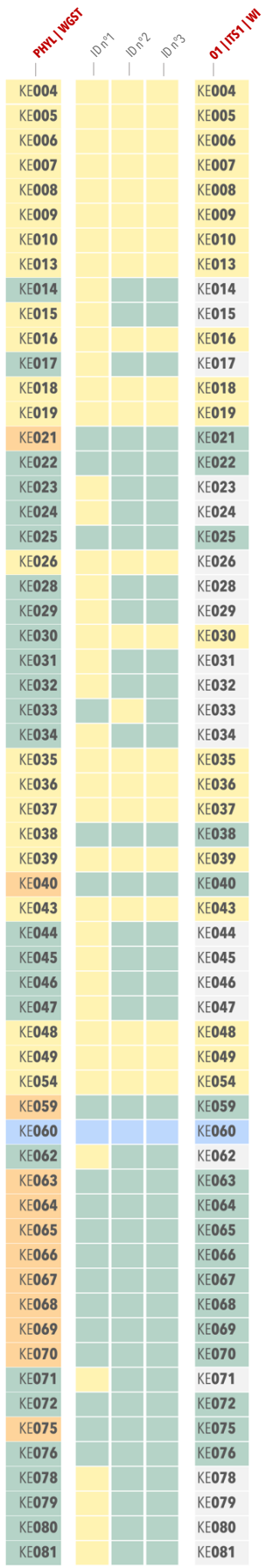
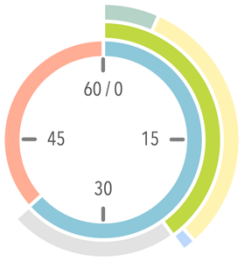


FIGURE 4.30. Classification des dermatophytes par l'approche 01 | ITS1 | WI

T. mentagrophytes
T. interdigitale
T. indotineae
N. persicolor



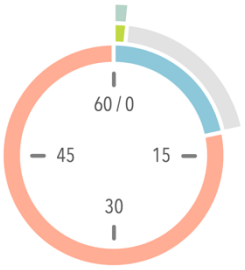
Niveau 1
- Identifié : **38** (63,33%)
- Non-identifié : **22** (36,67%)

Niveau 2
- Identification correcte : **24** (40%)
- Identification erronée : **14** (23,33%)

Niveau 3
- *T. mentagrophytes* : **4** (6,66%)
- *T. interdigitale* : **19** (31,67%)
- *T. indotineae* : **0** (0%)
- *N. persicolor* : **1** (1,67%)

FIGURE 4.31. Performance de l'ID par l'approche 01 | ITS1 | WI

Sur les 60 souches étudiées, 38 identifications sont retenues. Parmi celles-ci, 24 concordent avec celles obtenues par l'approche PHYL | WGST. La performance de la méthode (à l'échelle de tout l'échantillon) est donc de 40%.



Niveau 1
- Identifié : **13** (21,67%)
- Non-identifié : **47** (78,33%)

Niveau 2
- Identification correcte : **1** (1,67%)
- Identification erronée : **12** (20%)

Niveau 3
- *T. mentagrophytes* : **1** (1,67%)
- *T. interdigitale* : **0** (0%)
- *T. indotineae* : **0** (0%)
- *N. persicolor* : **0** (0%)

FIGURE 4.33. Performance de l'ID par l'approche 02 | ITS2 | WI

Sur les 60 souches étudiées, 13 identifications sont retenues. Parmi celles-ci, une seule concorde avec celle obtenue par l'approche PHYL | WGST. La performance de la méthode (à l'échelle de tout l'échantillon) est donc de 1,67%.



Niveau 1
- Identifié : **60** (100%)
- Non-identifié : **0** (0%)

Niveau 2
- Identification correcte : **59** (98,33%)
- Identification erronée : **1** (1,66%)

Niveau 3
- *T. mentagrophytes* : **25** (41,66%)
- *T. interdigitale* : **21** (35%)
- *T. indotineae* : **12** (20%)
- *N. persicolor* : **1** (1,67%)

FIGURE 4.34. Performance de l'ID par l'approche 03 | ITS1 | NCBI

Sur les 60 souches étudiées, toutes les identifications obtenues ont été retenues. Parmi celles-ci, 59 concordent avec celles obtenues par l'approche PHYL | WGST. La performance de la méthode (à l'échelle de tout l'échantillon) est donc de 98,33%.

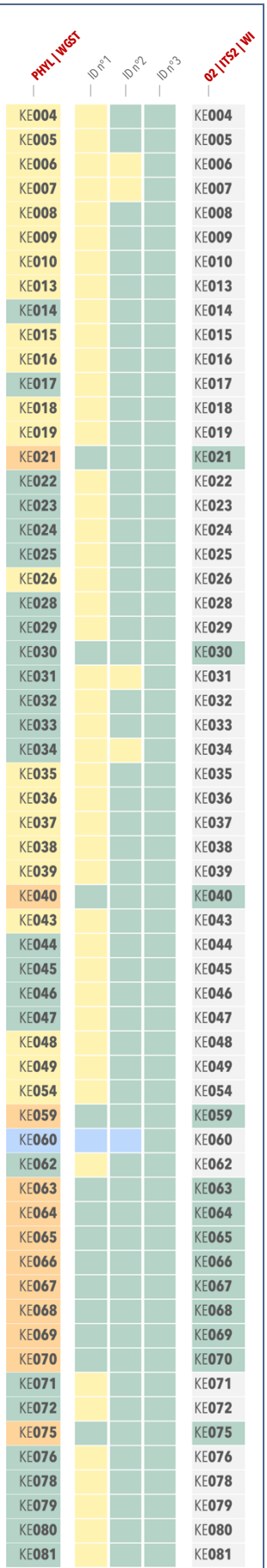


FIGURE 4.32. Classification des dermatophytes par l'approche 02 | ITS2 | WI

4.9.4. Approche phylogénétique : 02 | ITS2 | WI

Cette seconde approche est identique en tous points à la première, si ce n'est qu'elle se base sur la séquence ITS2 et non la séquence ITS1. Comme attendu, la discrimination des espèces sur base de l'ITS2 est délicate et seule l'espèce *T. indotineae* est distinguée des deux autres espèces qui forment le complexe (**FIGURE 4.32**). Pour ce qui est des espèces *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale*, l'identification basée sur l'ITS2 combinée à la DB du WI ne remplit pas les critères prédéfinis (3 fois la même identification avec une similarité supérieure à 95%. En termes de chiffres, sur les 60 souches analysées, seules 13 identifications sont retenues. Parmi ces dernières, une seule souche (KE030) correspond à la bonne identification. Les 12 autres identifications correspondent aux *T. indotineae* de l'étude, mais sont identifiés comme *T. mentagrophytes* par cette approche. La performance de cette approche est donc minimale (**FIGURE 4.33**). Une hypothèse peut être émise à ce stade : la DB du WI contient des souches, caractérisées comme *T. mentagrophytes* mais qui appartiennent en réalité à l'espèce *T. indotineae*. Ces souches sont donc mal caractérisées.

4.9.5. Approche phylogénétique : 03 | ITS1 | NCBI

Pour cette troisième approche, les souches sont identifiées grâce à la DB du NCBI et ce, sur base de leur séquence ITS1. A nouveau, le résultat est considéré fiable si la DB identifie 3 fois la même espèce avec un score de similarité supérieur à 95%. La performance de cette approche est bien supérieure aux deux précédentes (**FIGURE 4.34**). L'identification obtenue a été retenue pour la totalité des 60 souches. Parmi celles-ci, 59 souches ont été correctement identifiées (**FIGURE 4.35**). Cette approche souligne l'importance de la DB pour les méthodes basées sur un alignement de séquences. Bien qu'elles se basent sur la même séquence (ITS1), l'approche 01 | ITS1 | WI et l'approche 03 | ITS1 | NCBI montrent un taux d'identification correcte qui varie du simple au double (40% pour la première contre 98,33% pour la seconde).

4.9.6. Approche phylogénétique : 04 | ITS2 | NCBI

Identique à l'approche précédente en termes de méthodologie, cette quatrième approche étudie la séquence ITS2 (**FIGURE 4.36**). Pour celle-ci, l'identification obtenue a été retenue pour une seule souche. Cette approche souligne l'importance du choix de la séquence. Malgré une DB fournie, une séquence qui ne diverge pas suffisamment entre les espèces (c'est le cas de la séquence ITS2) ne peut suffire à discriminer ces dernières. Dans ce cas-ci, hormis la souche KE060 qui a généré une identification correcte, aucune autre souche n'a pu être identifiée 3 fois comme appartenant à la même espèce et ce, avec un score de similarité supérieur à 95%. L'analyse de la performance montre un graphe très différent des 4 précédents (**FIGURE 4.37**).

4.9.7. Approche phylogénétique : 05 | TEF1a | NCBI

Cette approche se base sur la séquence TEF1a des dermatophytes étudiés. Comme évoqué précédemment dans ce travail, cette séquence fût proposée pour le rôle de code barre secondaire pour cataloguer les champignons. Étant plus longue que les séquences ITS1 et ITS2, celle-ci devrait avoir, en théorie du moins, une meilleure résolution pour la distinction des espèces formant le complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. En pratique, cette approche se montre effectivement capable de distinguer les *T. interdigitale* des *T. mentagrophytes*. Une lacune peut néanmoins être observée ici. De manière assez intéressante, cette méthode identifie les dermatophytes de l'espèce *T. indotineae* systématiquement comme appartenant à l'espèce *T. mentagrophytes* à l'instar de ce qui avait pu être observé avec la DB du WI (**FIGURE 4.38**). Cette lacune fait chuter la performance de la méthode à 80% et ce, malgré son excellente résolution pour la distinction des espèces *T. mentagrophytes / interdigitale* (**FIGURE 4.39**). L'explication avancée est la suivante : l'espèce *T. indotineae* ayant été récemment définie, la DB du NCBI ne contient surement pas (ou très peu) de séquences TEF1a appartenant à cette espèce. Il ne fait aucun doute que les futures mises à jour apporteront une solution à ce problème.

4.9.8. Approche phylogénétique : 06 | ITS1 | MLT

Les trois approches qui suivent sont basées sur les mêmes séquences (ITS1, ITS2 et TEF1a). Cependant, la méthodologie est différente : il s'agit ici d'aligner les séquences entre elles et d'inférer, sur base de cet alignement, un arbre par maximum de vraisemblance afin de tenter de discriminer les espèces du complexe étudié sans avoir recours à une quelconque DB (d'où le nom de l'approche, MLT pour *Maximum Likelihood Tree*). La première de ces approches applique cette méthodologie à la séquence ITS1 (**FIGURE 4.40**). Le résultat fait apparaître un clade distinct pour les dermatophytes appartenant à l'espèce *T. indotineae*. La totalité des souches appartenant à cette espèce sont correctement identifiées par cette approche. Pour ce qui est des 2 autres espèces du complexe, la discrimination par cette approche est globalement correcte, exception faite pour les souches KE029, KE045 et KE015, que le dendrogramme classe à tort au sein des *T. indotineae*. Pour ce qui est de la performance, elle est de 98,30% pour cette méthode. Légèrement inférieure à l'approche 03 | ITS1 | NCBI, ce score de performance s'avère largement supérieur à ce qui était obtenu par l'approche 01 | ITS1 | WI. Ce résultat montre que lorsque la séquence ITS1 est considérée, un alignement au sein de la DB du NCBI donne les meilleures identifications (**FIGURE 4.41**).

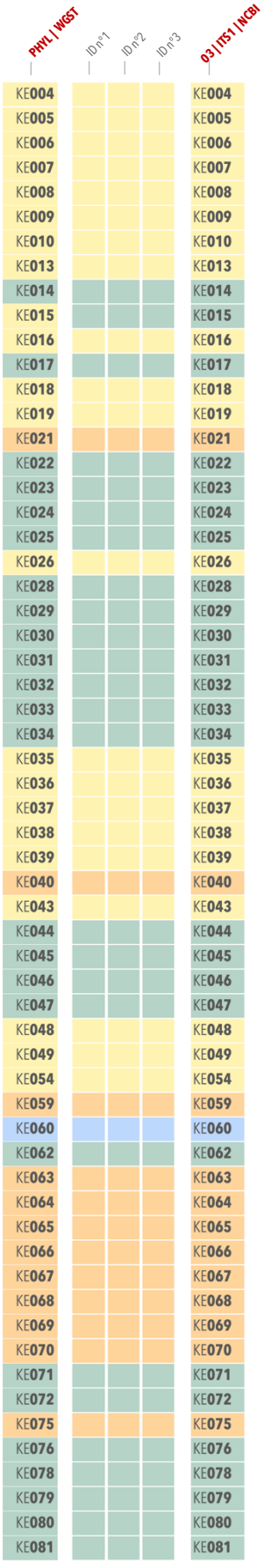


FIGURE 4.35. Classification des dermatophytes par l'approche 03 | ITS1 | NCBI



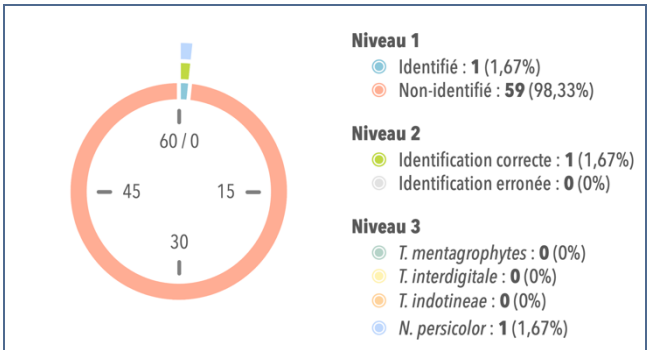


FIGURE 4.37. Performance de l'ID par l'approche 04 | ITS2 | NCBI

Sur les 60 souches étudiées, une seule identification est retenue. Il s'agit également de la seule identification qui concorde avec celle obtenue par l'approche PHYL | WGST. La performance de la méthode (à l'échelle de tout l'échantillon) est donc de 1,67%.

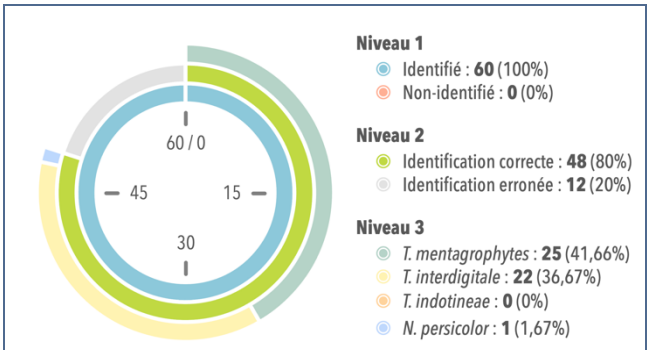


FIGURE 4.39. Performance de l'ID par l'approche 05 | TEF1a | NCBI

Sur les 60 souches étudiées, toutes les identifications obtenues ont été retenues. Parmi celles-ci, 48 concordent avec celles obtenues par l'approche PHYL | WGST. La performance de la méthode (à l'échelle de tout l'échantillon) est donc de 80%.

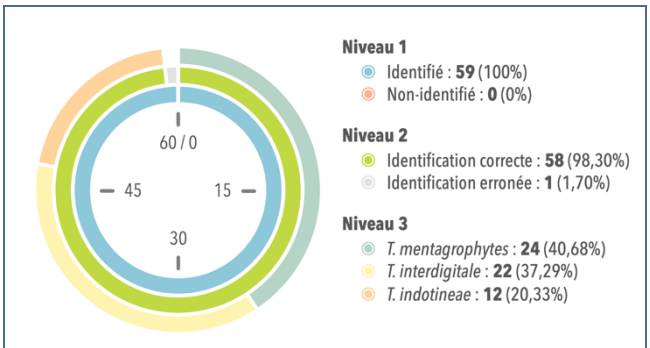


FIGURE 4.41. Performance de l'ID par l'approche 06 | ITS1 | MLT

Sur les 59 souches étudiées, toutes les identifications obtenues ont été retenues. Parmi celles-ci, 56 concordent avec celles obtenues par l'approche PHYL | WGST. La performance de la méthode (à l'échelle de tout l'échantillon) est donc de 98,30%.

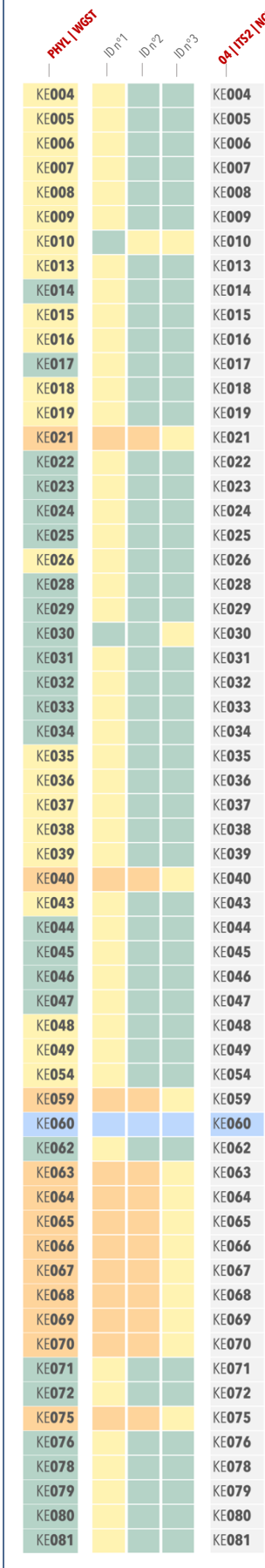


FIGURE 4.36. Classification des dermatophytes par l'approche 04 | ITS2 | NCBI

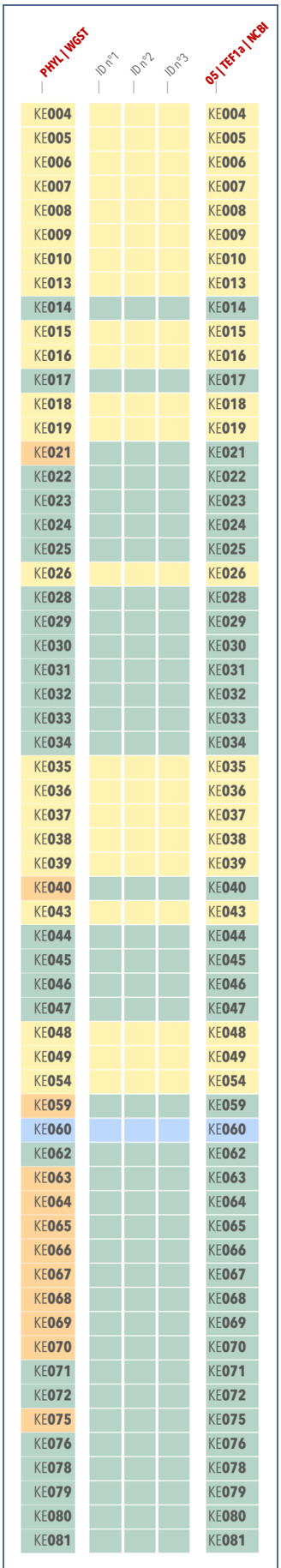


FIGURE 4.38. Classification des dermatophytes par l'approche 05 | TEF1a | NCBI



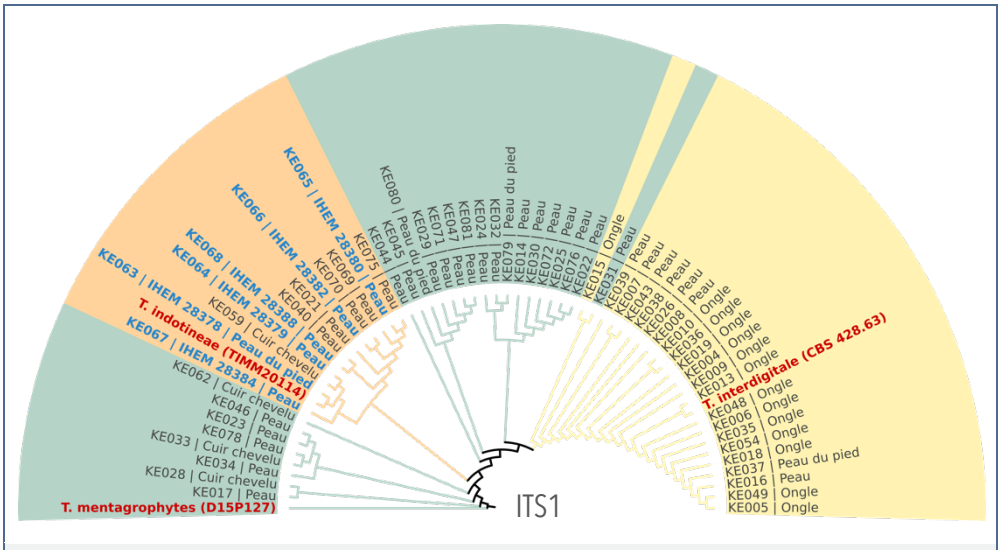


FIGURE 4.40. Classification des dermatophytes par l'approche 06 | ITS1 | MLT

Les nœuds externes sont colorés selon l'identification obtenue par l'approche PHYL | WGST. Le résultat montre une bonne distinction des 3 espèces qui forment le complexe étudié, exception faite pour les souches KE015, KE029 et KE045 que cette approche classe dans le clade des *T. indotineae* tandis que l'approche PHYL | WGST les identifie respectivement comme *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* et *T. mentagrophytes*.

4.9.9. Approche phylogénétique : 07 | ITS2 | MLT

Identique à l'approche précédente si ce n'est qu'elle s'intéresse à la séquence ITS2, cette méthode possède une résolution largement inférieure lorsqu'il s'agit de distinguer les T. mentagrophytes des *T. interdigitale*. Ces 2 espèces apparaissent donc mélangées au sein de l'arbre, et seule l'espèce T. indotineae est distinguée des deux autres (***FIGURE 4.42***). En termes de performance, cette approche se révèle supérieure aux approches 02 | ITS2 | WI et 04 | ITS2 | NCBI, basées sur la même séquence mais qui fut traitée par un alignement au sein d'une DB (respectivement du WI et du NCBI). Néanmoins, avec un pourcentage d'identification correcte de 20,34%, celle-ci se classe loin derrière les approches basées sur l'ITS1 et sur le gène TEF1a (***FIGURE 4.43***).

4.9.10. Approche phylogénétique : 08 | TEF1a | MLT

Dernière approche à être explorée, cette méthode est basée sur le gène TEF1a analysé par la construction d'un arbre par maximum de vraisemblance. La précédente approche étudiant cette séquence a montré une excellente résolution pour la distinction des espèces *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale*. Cependant, une lacune avait pu être observée puisque les dermatophytes de l'espèce *T. indotineae* étaient systématiquement identifiés comme appartenant à l'espèce *T. mentagrophytes*. L'approche actuelle permet de corriger cette lacune tout en conservant le haut pouvoir de résolution précédemment observé pour la distinction des espèces *T. mentagrophytes/interdigitale* (***FIGURE 4.44***). Ceci permet d'augmenter la performance de la méthode, la faisant passer de 80% (***FIGURE 4.39***) à 100% (***FIGURE 4.45***).

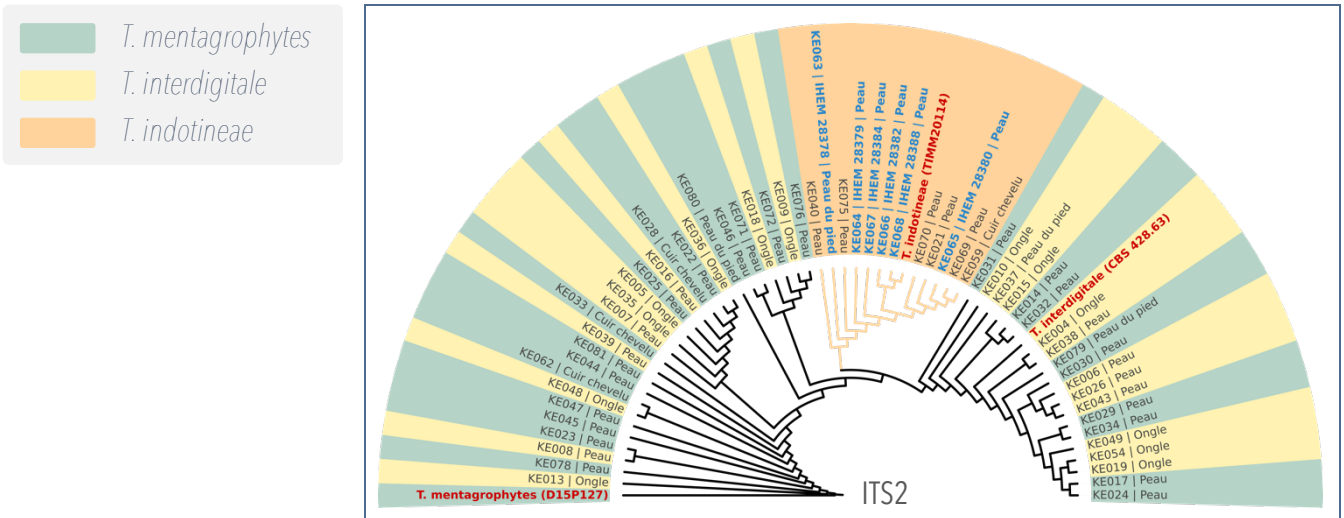


FIGURE 4.42. Classification des dermatophytes par l'approche 07 | ITS2 | MLT

Les nœuds externes sont colorés selon l'identification obtenue par l'approche PHYL | WGST. Cette approche se montre capable de distinguer les dermatophytes de l'espèce T. indotineae. Cependant, pour ce qui est des 2 autres espèces du complexe étudié, la distinction n'est pas possible sur base de la séquence ITS2 analysée par la création d'un arbre phylogénétique.

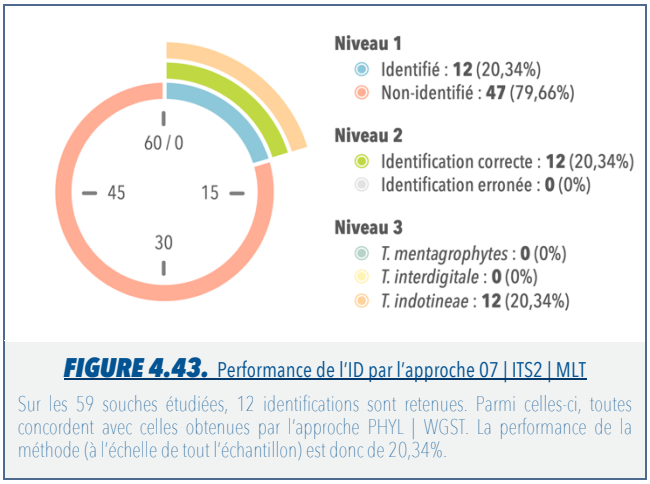


FIGURE 4.43. Performance de l'ID par l'approche 07 | ITS2 | MLT

Sur les 59 souches étudiées, 12 identifications sont retenues. Parmi celles-ci, toutes concordent avec celles obtenues par l'approche PHYL | WGST. La performance de la méthode (à l'échelle de tout l'échantillon) est donc de 20,34%.

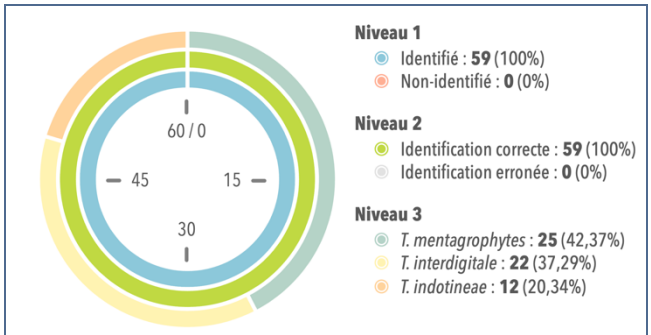


FIGURE 4.45. Performance de l'ID par l'approche 08 | TEF1a | MLT

Sur les 59 souches étudiées, toutes les identifications obtenues ont été retenues. Parmi celles-ci, 59 concordent avec celles obtenues par l'approche PHYL | WGST. La performance de la méthode (à l'échelle de tout l'échantillon) est donc de 100%.

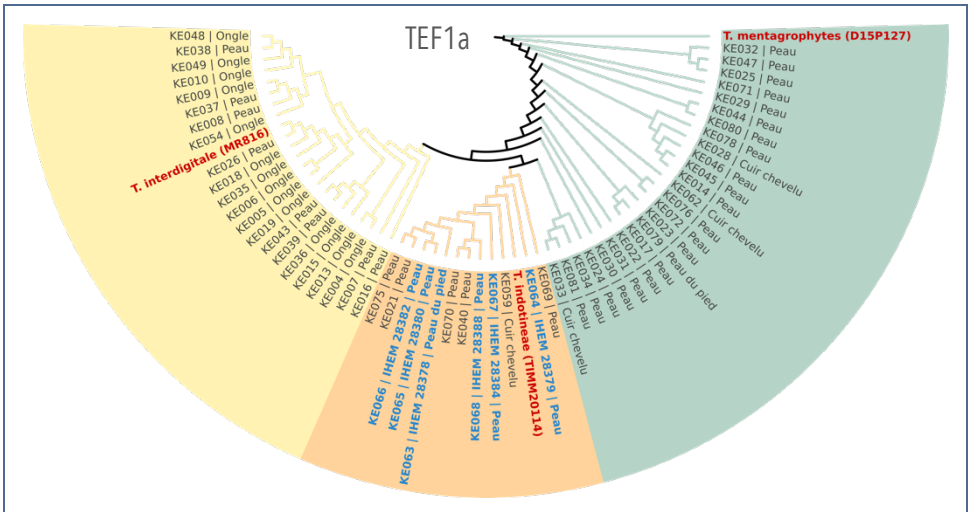


FIGURE 4.44. Classification des dermatophytes par l'approche 08 | TEF1a | MLT

Les nœuds externes sont colorés selon l'identification obtenue par l'approche PHYL | WGST. Trois clades distincts sont visibles. L'arbre se montre ainsi capable de distinguer efficacement les 3 espèces du complexe étudié.

T. mentagrophytes
T. interdigitale
T. indotineae
N. persicolor
Souche non-analysée
Souche non-identifiée

TABLEAU 4G. Comparaison des résultats obtenus selon les 10 méthodes d'identification testées

N°	GLIMS	Origine du prélèvement (+ détail)		ID rendue (GLIMS)	WI DB		NCBI DB			Arbres ML + séquences de référence			ANI	WGST
					ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	TEF1a	ITS1	ITS2	TEF1a		
KE**004**	13-170221-0030	Ongle	Gros orteil pied droit											
KE**005**	13-170314-0069	Ongle	Non-spécifié											
KE**006**	13-170607-0016	Ongle	Non-spécifié											
KE**007**	13-170626-0018	Peau	Non-spécifié											
KE**008**	13-170710-0034	Peau	Non-spécifié											
KE**009**	13-171026-0006	Ongle	Non-spécifié											
KE**010**	13-171026-0009	Ongle	Non-spécifié											
KE**013**	13-171228-0003	Ongle	Gros orteil pied droit											
KE**014**	13-180209-0032	Peau	Non-spécifié											
KE**015**	13-180507-0017	Ongle	Non-spécifié											
KE**016**	13-180604-0007	Peau	Non-spécifié											
KE**017**	13-180817-0102	Peau	Cuisse											
KE**018**	13-180925-0065	Ongle	Non-spécifié											
KE**019**	13-181008-0004	Ongle	Gros orteil pied gauche											
KE**021**	13-190220-0076	Peau	Joue droite											
KE**022**	13-190129-0017	Peau	Non-spécifié											
KE**023**	13-190226-0091	Peau	Pli inguinal											
KE**024**	13-190315-0029	Peau	Hanche droite											
KE**025**	13-190228-0018	Peau	Non-spécifié											
KE**026**	13-190326-0052	Peau	Non-spécifié											
KE**028**	13-190419-0055	Cheveux	Cuir chevelu											
KE**029**	13-190523-0057	Peau	Visage											
KE**030**	13-190808-0073	Peau	Bras											
KE**031**	13-190919-0037	Peau	Nez											
KE**032**	13-191127-0046	Peau	Genou											
KE**033**	13-191212-0072	Cheveux	Cuir chevelu											
KE**034**	13-191224-0067	Peau	Pommette											
KE**035**	13-191217-0023	Ongle	Non-spécifié											
KE**036**	13-200219-0080	Ongle	Non-spécifié											
KE**037**	13-200318-0095	Peau	Pied											
KE**038**	13-200529-0132	Peau	Nez											

Performance de l'approche :



T. mentagrophytes
T. interdigitale
T. indotineae
N. persicolor
Souche non-analysée
Souche non-identifiée

TABLEAU 4G. Comparaison des résultats obtenus selon les 10 méthodes d'identification testées

N°	GLIMS	Origine du prélèvement (+ détail)		ID rendue (GLIMS)	WI DB		NCBI DB			Arbres ML + séquences de référence			ANI	WGST
					ITS1	ITS2	ITS1	ITS2	TEF1a	ITS1	ITS2	TEF1a		
KE**039**	13-200803-0093	Peau	Plaie											
KE**040**	13-200707-0114	Peau	Non-spécifié											
KE**043**	13-201029-0245	Peau	Menton											
KE**044**	13-201105-0172	Peau	Menton											
KE**045**	13-201125-0228	Peau	Joue gauche											
KE**046**	13-201119-0244	Peau	Poignet gauche											
KE**047**	13-201125-0225	Peau	Cou											
KE**048**	13-201210-0193	Ongle	Non-spécifié											
KE**049**	13-210115-0033	Ongle	Non-spécifié											
KE**054**	13-210420-0192	Ongle	Non-spécifié											
KE**059**	13-180730-0023	Cheveux	Cuir chevelu											
KE**060**	13-180814-0029	Cheveux	Cuir chevelu											
KE**062**	13-180925-0031	Cheveux	Cuir chevelu											
KE**063**	IHEM n°28378	Peau	Pied											
KE**064**	IHEM n°28379	Peau	Non-spécifié											
KE**065**	IHEM n°28380	Peau	Non-spécifié											
KE**066**	IHEM n°28382	Peau	Non-spécifié											
KE**067**	IHEM n°28384	Peau	Visage											
KE**068**	IHEM n°28388	Peau	Pli inguinal											
KE**069**	13-210408-0015	Peau	Pli inguinal											
KE**070**	13-210507-0223	Peau	Non-spécifié											
KE**071**	13-211201-0059	Peau	Non-spécifié											
KE**072**	13-220207-0001	Peau	Tempe gauche											
KE**075**	13-220207-0005	Peau	Non-spécifié											
KE**076**	13-220112-0028	Peau	Dos de la main droite											
KE**078**	13-220112-0126	Peau	Dos de la main											
KE**079**	13-220218-0018	Peau	Plante du pied											
KE**080**	13-220218-0019	Peau	Dos du pied											
KE**081**	13-220214-0070	Peau	Bras droit											

Performance de l'approche :



DISCUSSION

5.1. Mise en culture

Cette discussion sera construite selon la chronologie expérimentale de cette étude. La première étape de cette méthodologie expérimentale a été la mise en culture des souches sélectionnées pour cette étude sur le milieu de culture Sabouraud Gentamicine Chloramphénicol Agar. A priori d'une facilité évidente, cette étape s'est avérée problématique pour de nombreux dermatophytes. Dix souches ont ainsi dû être écartées puisqu'aucune croissance n'a été observée malgré de multiples tentatives. Pour cette situation, aucune procédure n'existe au laboratoire si ce n'est relancer une culture dans les mêmes conditions. Il peut donc être intéressant d'étudier le problème afin de définir une procédure à appliquer pour les dermatophytes à croissance difficile. Une pléthore de milieux de culture existent pour les champignons. Sur l'un d'entre eux, certains auteurs ont révélé obtenir des cultures fongiques plus riches pour les champignons filamenteux : il s'agit du milieu de culture Potato Dextrose Agar (PDA). Il peut ainsi être envisagé de supplémenter ce milieu de culture avec des antibiotiques (chloramphénicol) et/ou antifongiques (cycloheximide) afin d'en faire une alternative intéressante au milieu de culture Sabouraud en cas de croissance difficile.

5.2. Détection des souches résistantes à la terbinafine

La seconde étape de la stratégie expérimentale de cette étude a été la détection des souches résistantes à la terbinafine. Cette étape est elle-même subdivisée en 2 méthodes : une première méthode de *screening* et une seconde méthode de confirmation. Pour la méthode de screening, deux problèmes se sont érigés : l'un à la préparation des plaques, l'autre à l'utilisation. Lors de la préparation des plaques, certains puits se sont avérés liquides malgré l'utilisation d'agar en amont. Aucune explication n'a été trouvée à ce phénomène. Néanmoins une piste peut être exploitée pour pallier ce problème. Lors de la préparation de ces plaques, le milieu de culture et l'agar sont mélangés dans un seul et même erlenmeyer (volume = 2L). Le contenu est ensuite réparti dans 4 autres erlenmeyers de 250 mL (1 par concentration de terbinafine) avant que ces derniers soient autoclavés. Plutôt que d'effectuer le mélange initial (Sabouraud + agar) dans le même erlenmeyer, il peut être judicieux de procéder en deux temps. La nouvelle procédure serait la suivante : après solubilisation du milieu de culture Sabouraud dans l'erlenmeyer de 2L, le contenu de ce dernier est réparti dans 4 erlenmeyers de 250 mL. C'est seulement après répartition que l'agar serait ajouté et ce, directement au sein des 4 erlenmeyers de 250 mL (et non avant répartition comme cela est fait actuellement). Cette petite adaptation du protocole devrait résoudre le problème rencontré lors de la préparation des plaques. Concernant l'utilisation de celles-ci, le problème rencontré fût le même que pour la croissance sur milieu Sabouraud : certaines souches ne donnaient lieu à aucune croissance dans le puit contrôle, invalidant par conséquent le résultat. Une des explications qui peut être avancée à ce stade est le phénomène de pression osmotique. En effet, une concentration trop élevée d'agar peut perturber l'équilibre osmotique des dermatophytes, empêchant par la même occasion leur croissance. L'une des solutions qui peut être envisagée est de réduire la concentration d'agar dans les puits. A nouveau, ceci devra faire l'objet d'une mise au point afin d'évaluer l'impact de cette adaptation sur la croissance des dermatophytes au sein du puit contrôle. Malgré cela, cette technique possède de nombreux avantages face à sa concurrente (la méthode de microdilution en milieu liquide) : elle est beaucoup plus simple d'utilisation, ne nécessite que peu de matériel de laboratoire, permet un résultat en seulement 4 jours (contre 7 jours pour la méthode de microdilution) et possède un coût plus faible. Étant donné que la majorité des phénomènes de résistance à la terbinafine sont observés en Inde (*Sacheli & Hayette, 2021*), un pays sous-développé économiquement parlant, la combinaison de ces avantages suffit à comprendre pourquoi cette méthode possède un fort potentiel. Puisqu'elle permet le *screening* rapide d'un grand nombre de souches en peu de temps et à moindre coût, cette méthode pourrait permettre une meilleure évaluation de la distribution des dermatophytes résistants à la terbinafine et pourrait indirectement ouvrir la porte à la découverte de nouvelles mutations au sein du gène de la SQLE, voire révéler de nouveaux mécanismes de résistance inconnus à ce jour. Les résultats de cette étude (et des précédentes études menées par le CNRML) ont servi à renforcer cette idée, puisque les résultats obtenus par la méthode de microdilution en milieu liquide, actuellement désignée comme méthode de référence, sont en majorité identiques à ceux obtenus par la méthode de *screening*. Dans la littérature, plusieurs auteurs ont eu recours à une méthodologie similaire (*screening* à large échelle suivi d'une confirmation du profil de résistance par la méthode de référence) pour l'étude des phénomènes de résistance à la terbinafine au sein des dermatophytes. La dernière en date est une étude multicentrique française, dont les résultats furent publiés en février 2022 (*Moreno-Sabater et al., 2022*). Les auteurs y décrivent une méthode nommée TCAM (pour *Terbinafine-containing agar medium*) qui leur a permis de réaliser le *screening* de 580 souches de dermatophytes en seulement sept mois. Dans les faits, cette méthode fut décrite 5 ans auparavant (*Yamada et al., 2017*). Elle consiste à mettre en culture le dermatophyte étudié sur un milieu Sabouraud-agar supplémenté de terbinafine à une concentration de 0,2 µg/mL. Bien qu'apparentée à la méthode de *screening* sur plaques du CNRML, la méthode TCAM possède un inconvénient de taille que ne partage pas la première : l'absence de contrôle de croissance. Il n'est dès lors pas possible d'établir avec certitude que l'inhibition de la croissance résulte de l'interaction avec la terbinafine contenue dans le milieu de culture. Au sein de cette étude, l'application de la méthode de *screening* du CNRML combinée à une confirmation du profil de résistance par la méthode de référence a permis de mettre en évidence 9 souches résistantes à la terbinafine parmi les 60 étudiées. Parmi celles-ci, 1 souche est identifiée comme *T. mentagrophytes* tandis que les 8 autres sont classés dans le clade des *T. indotineae*. Au sein de ce clade, 4 souches sont des souches de référence de la collection BCCM/IHEM. A ce titre, elles ne sont pas prises en compte pour le calcul de la fréquence des résistances qui suit.

Ceci laisse au total 5 souches cliniques (dont 4 *T. indotineae* et 1 *T. mentagrophytes*). A l'échelle de l'échantillon de dermatophytes étudié (dont le nombre a été ramené à 54 suite à l'exclusion des souches de référence), ceci représente une fréquence de 9,26%. Cette étude est la première en Belgique à établir une approximation de la fréquence des dermatophytes du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* résistants à la terbinafine. Une étude en cours lancée par le CNRML établira cette fréquence plus justement et plus largement au niveau national sur un plus large nombre de souches. Des études similaires ont permis d'estimer cette fréquence à l'étranger. En Iran, cette fréquence est établie à 4,88% (*Pashootan et al., 2022*). En France, une étude multicentrique publiée en février 2022 a permis de caractériser 580 souches de dermatophytes issues des 4 coins du pays (*Moreno-Sabater et al., 2022*). Parmi ces 580 souches, 2 se sont révélées résistantes à la terbinafine, soit une fréquence de 0,34%. Au Japon, le dernier relevé épidémiologique en date indique une fréquence de la résistance à la terbinafine de 2,38% (*Hiruma et al., 2020*) tandis qu'en Suisse, la fréquence est de 0,82% (*Yamada et al., 2017*). En Grèce, Siopi et ses collègues ont analysé 112 dermatophytes en 2021. Parmi ces derniers, 9 souches se sont révélées résistantes à la terbinafine, établissant la fréquence pour ce pays à 8% (*Siopi et al., 2021*). Ces chiffres, bien qu'alarmants et annonciateurs de l'émergence de phénomènes de résistance à la terbinafine sur le vieux continent restent très largement en-deçà de ce qui peut être observé en Inde. Dans ce pays où les phénomènes de résistance à la terbinafine sont légion, il a été fait mention d'un taux de résistance allant jusqu'à 32% (*Singh et al., 2018*). La comparaison de ces fréquences est néanmoins à considérer avec précaution puisque les cohortes étudiées varient fortement, à la fois en termes de taille que d'espèces représentées. Pour cette étude, la taille de la cohorte est de 60 dermatophytes, très loin derrière les 2056 isolats analysés par Yamada et ses collègues (*Yamada et al., 2017*). Par ailleurs, 2 méthodes co-existent pour la détermination de la CMI à un antifongique : la méthode EUCAST telle qu'utilisée ici et la méthode CLSI (Clinical & Laboratory Standards Institute). De manière générale, si les études menées en Europe utilisent la méthode EUCAST, les pays situés sur les autres continents (et notamment l'Inde et le Japon, très actifs dans le domaine de la recherche sur les dermatophytes) ont souvent recours à la méthode CLSI. L'absence d'une méthode commune internationalement reconnue complique quelque peu la comparaison des données. Cependant, les chiffres existants suffisent à alarmer quant à l'émergence des phénomènes de résistance en dehors de l'Inde. Très rares avant 2017, les cas de résistance à la terbinafine se sont multipliés au fil des années, y compris en Belgique. En Inde, la situation s'est très rapidement détériorée et le pays connaît aujourd'hui une épidémie de variants résistants. La présente étude a servi à démontrer 2 faits. Le premier est que la Belgique n'est pas épargnée par ces variants résistants. Le second est que l'espèce *T. indotineae* récemment définie circule bel et bien en Belgique et ce, depuis 2018 au moins (la souche KE059, résistante à la terbinafine, est classée par cette étude dans le clade *T. indotineae*). Les dernières années ont été marquées par la pandémie du virus SARS-CoV-2, à laquelle la majorité des pays à travers monde ont répondu par une fermeture des frontières engendrant par la même occasion une réduction drastique des flux touristiques et migratoires. La question qui se pose alors est la suivante : quel en a été l'impact sur la circulation mondiale des souches de dermatophytes résistantes à la terbinafine ? L'hypothèse qui peut être émise à ce stade est que cette réduction des flux a eu un impact protecteur en Europe vis-à-vis de l'importation des souches résistantes originaires de l'Inde. Si cette hypothèse est vérifiée, sachant que les restrictions liées aux voyages sont levées les unes après les autres et que les flux tendent à retrouver leur niveau d'avant la crise, la menace qu'encourt l'Europe est bien plus imminente que ce que laissent présager les chiffres actuels. Plus que jamais, la vigilance est de mise. Dans ce contexte, la méthode de *screening* telle qu'elle a été utilisée dans cette étude a toute sa place dans les laboratoires de microbiologie.

5.3. Extraction de l'ADN

La troisième étape de la stratégie expérimentale est l'extraction de l'ADN. Les dermatophytes sont des microorganismes qui appartiennent au règne des champignons. A ce titre, ces derniers possèdent une paroi rigide formée de polymères complexes. En pratique, il peut s'avérer très difficile de rompre cette paroi, constituant ainsi l'un des principaux freins à une extraction efficace de l'ADN. L'autre frein est inhérent à la croissance des dermatophytes. Afin de procéder à l'extraction de leur ADN, les dermatophytes sont mis en culture en milieu liquide. Le matériel ainsi récupéré est très faible. Un dilemme se pose alors : il peut être tentant de laisser croître la souche plus longtemps afin de récupérer plus de matériel et, en toute logique, augmenter les rendements d'extraction de l'ADN. Cependant, procéder ainsi peut s'avérer contre-productif dans la mesure où la paroi s'épaissit, rendant finalement l'extraction d'autant plus compliquée. Lors de cette étude, 2 protocoles d'extraction ont été évalués : le protocole NucleoSpin et le protocole DNEasy. Aucun de ces deux protocoles n'a fait l'objet d'une mise au point du facteur temps de croissance des dermatophytes. Il est donc nécessaire de procéder à des essais afin de déterminer la durée d'incubation idéale pour l'extraction de l'ADN. Dans le cadre de cette étude, le temps de croissance a été arbitrairement fixé à 96h pour la comparaison des deux protocoles d'extraction. Dans ces conditions, il a été prouvé que les rendements obtenus avec le second protocole (DNEasy) sont statistiquement plus élevés que ceux obtenus par le premier (NucleoSpin). Ceci peut, en partie du moins, être expliqué par la nature du choc thermique infligé. La lecture du protocole de chaque extraction révèle un choc thermique d'une amplitude bien plus large pour le protocole DNEasy (266° d'amplitude au total). A titre de comparaison, l'amplitude du choc thermique subi par les dermatophytes lors de l'application du protocole NucleoSpin n'est que de 90°, soit à peine 30% du choc thermique infligé par le protocole DNEasy.

Le second protocole possède néanmoins des inconvénients par rapport au premier : il contient plus d'étapes (et est donc plus fastidieux), les étapes d'incubation sont plus longues et il fait intervenir un choc thermique à l'azote liquide, qui peut s'avérer dangereux à manipuler. De plus, les rendements d'extractions obtenus restent faibles. A titre d'exemple, lors d'une précédente étude du CNRML, les rendements obtenus en utilisant le protocole NucleoSpin pour l'extraction d'ADN à partir de l'espèce bactérienne *Streptococcus agalactiae* oscillent autour de 300 ng/µL (*Egrek, 2020*) là où ceux obtenus avec les dermatophytes dépassent rarement 20 ng/µL. Pour les analyses basées sur une PCR (notamment la PCR ITS ou encore la PCR DermaGenius), la quantité d'ADN nécessaire pour une amplification réussie est très faible. Les faibles rendements obtenus avec les dermatophytes sont donc suffisants pour mener à bien celles-ci. Ceci a ouvert la porte à l'utilisation d'une extraction d'ADN automatisée, rapide et peu fastidieuse pour l'opérateur. En revanche, pour réaliser un séquençage entier du génome, les conditions requises sont plus strictes. D'une part, l'ADN doit être le moins fragmenté possible et d'autre part, une concentration minimale de 1 ng/µL est demandée. Pour ces raisons, l'extraction de l'ADN pour les dermatophytes est effectuée manuellement afin de garantir un rendement maximal. Lors de cette étude, 5 souches ont dû être écartées car le rendement d'extraction obtenu n'était pas suffisant pour permettre un séquençage à haut-débit. Or l'extraction de l'ADN représente le point de départ des analyses génétiques, qui prennent de plus en plus de place au cœur du diagnostic en microbiologie. Tant que celle-ci n'est pas fiabilisée, il ne peut être envisagé de remplacer les méthodes actuelles de diagnostic par des méthodes basées sur le séquençage du génome. De nombreuses pistes peuvent être explorées à cette fin. Partant du constat que la chitine est le constituant principal des parois fongiques, certains auteurs ont tenté une approche par traitement à la chitinase (*Bir et al., 1995*) pour fragiliser la paroi en vue de l'extraction de l'ADN, ce qui a permis d'augmenter significativement les rendements d'extraction. En voulant reproduire la manipulation, des chercheurs du département de microbiologie de l'Université de Delhi en Inde ont observé une forte fragmentation de l'ADN ainsi extrait (*Kuhad et al., 2004*), ce qui n'est pas compatible avec une utilisation dans le cadre du séquençage du génome. Dans la même optique, l'utilisation d'une lyticase, une enzyme qui hydrolyse les poly-β(1→3)-glucose de la paroi des dermatophytes devrait permettre de fragiliser la paroi de ces derniers. Cette approche est décrite dans la littérature (*Kumar & Mugunthan, 2017*). Outre l'utilisation d'enzymes, il existe des méthodes physiques pour fragiliser la paroi des dermatophytes : c'est le cas de la sonication, qui permet d'appliquer des contraintes de cisaillement par ultrasons à la paroi. Cependant, les contraintes de cisaillement infligées par cette méthode peuvent altérer l'ADN, ce qui serait contre-productif pour les applications de type séquençage du génome. Dans la même optique, soumettre l'échantillon à une pression élevée peut aider à lyser les dermatophytes. A l'inverse de la sonication, cette méthode permet un ajustement précis des contraintes infligées, ce qui réduit les dommages de l'ADN. La *french press* peut être envisagée à cette fin. Le principe de cette technique est le suivant : il s'agit d'utiliser une pompe hydraulique externe pour actionner un piston dans un cylindre contenant lui-même la suspension de dermatophytes. Ceci augmente la pression au sein du cylindre, qui peut atteindre 2700 fois la pression atmosphérique. L'échantillon sous haute-pression passe ensuite à travers une valve, ce qui lui fait subir des contraintes de cisaillement. Lorsqu'elles sont soumises à ces contraintes, les parois et les membranes plasmiques se désintègrent, facilitant ainsi l'extraction de l'ADN. Toutes ces méthodes agissent au même stade de l'extraction : les étapes préliminaires de lyse. D'autres solutions peuvent être envisagées en aval. C'est le cas de la précipitation de l'ADN total à l'éthanol glacé. Ceci devrait permettre, après resolubilisation, de maximiser les rendements d'extraction. Enfin, une dernière piste pourrait être explorée : les dispositifs SpeedVac de ThermoScientific. Ces derniers permettent de concentrer artificiellement l'ADN. Il peut ainsi être envisagé de procéder à une extraction en triplicatas (3x 50µL d'ADN élué) avant de concentrer ces derniers en un seul échantillon de 50 µL grâce au système SpeedVac.

5.4. Séquençage du génome

Lorsque l'ADN a été extrait et purifié, il est envoyé à la plateforme GIGA Genomics afin qu'il soit séquencé : ceci constitue l'étape suivante du processus. Un chapitre entier peut être dédié aux avantages et inconvénients du séquençage à haut-débit. Néanmoins, l'idée ici n'est pas de discuter de cette méthode dans sa généralité mais plutôt dans le cadre précis de son application aux dermatophytes et plus particulièrement aux espèces *T.interdigitale/mentagrophytes/indotineae* sur lesquelles l'attention a été focalisée au cours de ce projet. L'avantage principal de cette méthode, lorsqu'elle est appliquée aux dermatophytes, est la rémanence des données qui en résultent. Lorsqu'un test est réalisé (peu importe lequel), les informations qui peuvent en être tirées sont limitées et définies à l'avance. Il en va de même pour les analyses basées sur la PCR : les informations qui peuvent être tirées du résultat sont limitées à la séquence amplifiée. A l'inverse, lorsque le génome entier est connu (à la suite du séquençage à haut-débit), les informations qui peuvent en être tirées sont potentiellement illimitées, y compris dans le temps. Pour un domaine qui évolue assez rapidement (comme c'est le cas pour la mycologie), ceci constitue un avantage non-négligeable. Actuellement, le CNRML possède une collection de dermatophytes qu'il étend au fur et à mesure grâce aux souches rencontrées en routine. Ces souches sont conservées à -80°C et sont remises en culture dans le cadre d'études menées *a posteriori*. Une certaines part de ces souches ne survivent pas aux cycles gel/dégel et sont perdues à jamais. Pour celles qui demeurent viables, leur conservation n'est pas éternelle à cette température. Dans les faits, elle dépasse rarement la décennie. Le séquençage à haut-débit apporte une solution à ce problème : là où il peut s'avérer délicat de conserver du matériel biologique, il n'en est rien pour la conservation du génome sous format électronique. A l'heure des technologies basées sur le *cloud computing*, le séquençage à haut-débit permet, en théorie, de conserver la trace d'un dermatophyte éternellement.

La logistique derrière la collaboration entre les centres d'études s'en trouve également simplifiée : là où il est couteux, risqué et long d'échanger des dermatophytes, l'échange de l'information génétique est instantané, sans risque et gratuit. Ceci peut potentiellement permettre une collaboration à plus grande échelle entre les laboratoires et déboucher sur l'intégration d'un plus grand nombre de souches dans les études qui visent à comprendre la place qu'occupent les dermatophytes et les phénomènes de résistance qui émergent. A ce stade, un certain nombre d'obstacles se dressent néanmoins face à l'adoption massive du séquençage à haut-débit par les laboratoires. Le premier de ces obstacles est le coût de l'analyse (qui se chiffre approximativement à 120€ par souche). Ceci est néanmoins à mettre en perspective de la multitude d'informations apportées par le NGS. En effet, le cout d'une PCR s'élève approximativement à 15€. Au sein de cette étude, 7 marqueurs (Mep1, Mep2, Mep3, Mep4, Mep5, Sub6 et SQLE) ont été analysés et cette liste pourrait être fortement accrue selon les besoins. Pour la classification phylogénétique, 3 séquences d'ADN ont été utilisées (ITS1, ITS2 et TEF1a). Pour obtenir la même quantité d'informations grâce aux techniques basées sur la PCR, 10 amplifications auraient été nécessaires pour un coût total supérieur à 150€ par souche. La conclusion qui peut être tirée de ceci est la suivante : pour l'identification de l'espèce (qui ne fait intervenir qu'une ou deux PCR), le NGS s'avère excessivement couteux. En revanche, pour le typage moléculaire des souches (qui fait souvent intervenir plusieurs marqueurs), l'écart de coût entre les techniques basées sur la PCR et le séquençage à haut débit se réduit fortement, jusqu'à une inversion complète de la tendance. Le séquençage à haut-débit devient alors plus abordable que les méthodes concurrentes. Concernant l'évolution des coûts du séquençage (***FIGURE 5.01***), la chute a été bien plus fulgurante que tout ce que les prévisions, même les plus optimistes, auraient pu prévoir. A la vue de ce graphique, il ne fait aucun doute qu'à l'avenir, le séquençage à haut-débit deviendra encore plus abordable qu'actuellement. L'obstacle du coût s'estompera donc au fur et à mesure. Le second obstacle à l'adoption massive du séquençage à haut-débit concerne le délai d'attente, qui s'établi à plusieurs semaines (en moyenne 6 semaines) pour le séquençage des dermatophytes. Ceci peut être expliqué par le recours à des services externes pour la réalisation de l'analyse (comme c'est le cas pour le CNRML, qui s'appuie sur l'expertise de la plateforme GIGA Genomics). Actuellement, il n'est pas envisageable pour un service de microbiologie d'investir dans un séquenceur de type Illumina pour réaliser les séquençages en interne. D'une part, ceci constitue un coût difficile à amortir dans le temps et d'autre part, l'utilisation de ces automates nécessite une forte expertise. Néanmoins, des solutions plus abordables existent : c'est le cas du séquenceur d'Oxford Nanopore. Comme expliqué dans l'introduction de ce travail, cette approche est entachée d'un taux d'erreur élevé, ce qui restreint ses applications. Cela étant dit, cet appareil a toute sa place dans un laboratoire de microbiologie, surtout en ce qui concerne le typage moléculaire. Son utilisation permettrait d'effectuer le séquençage en interne, ce qui réduirait quelque peu le coût mais surtout le délai d'attente d'une analyse. Un pack de démarrage du modèle d'entrée de gamme (minION) est proposé par la firme pour 900 € tandis que 810 € sont nécessaires pour l'acquisition d'une *FC* compatible. Cette dernière est néanmoins réutilisable jusqu'à 5 fois. Bien que ces prix soient largement inférieurs à ceux d'un séquenceur Illumina, il faut y ajouter le coût de la formation du personnel à l'utilisation de ces nouvelles technologies ainsi que le coût des divers réactifs nécessaires à la préparation des échantillons. Malgré cela, l'investissement est amorti très rapidement. Le troisième obstacle abordé ici concerne l'expertise bio-informatique nécessaire pour traiter les données issues du séquençage à haut-débit. Nécessitant un grand nombre d'outils pour la plupart dépourvus d'interface graphique, le traitement des données de séquençage peut s'avérer compliqué sans un minimum de compétences. Néanmoins, de plus en plus de programmes et/ou services permettent d'automatiser cette tâche par des logiciels simples d'utilisation, à l'instar de WGST (*Hedera-22, 2020*). D'autres adoptent une approche différente : c'est le cas de la plateforme Galaxy (*Afgan et al., 2022*), qui propose non pas d'automatiser le processus mais d'ajouter une interface graphique intuitive aux outils bio-informatiques existants, supprimant par la même occasion la nécessité d'une initiation à Linux et à l'utilisation de bash. Ces initiatives ouvrent les portes du séquençage à haut-débit à n'importe qui souhaitant analyser ses fichiers fastq sans compétences particulières. Enfin, le dernier obstacle abordé ici concerne le temps nécessaire pour effectuer les manipulations bio-informatiques sur les données brutes issues du séquençage du génome.

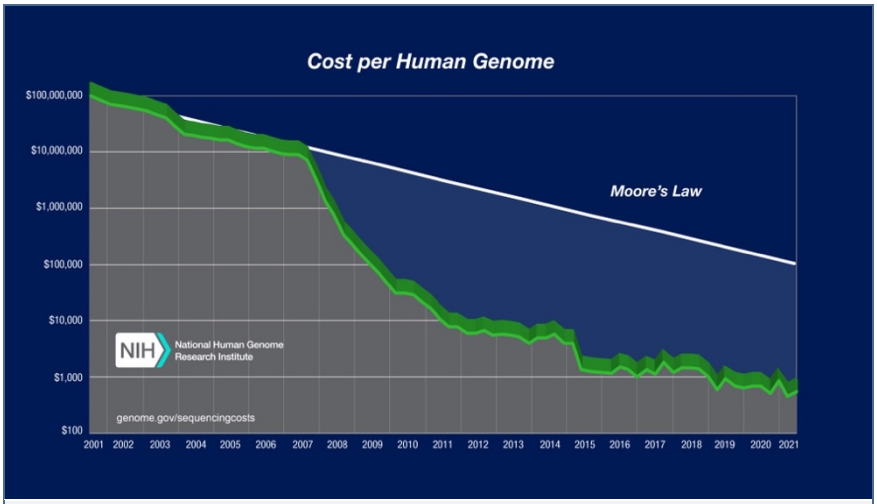


FIGURE 5.01. Évolution du coût de séquençage par génome au cours des 20 dernières années

La loi de Moore, paradigme de l'informatique qui s'est avéré vrai depuis sa formulation en 1965, est une loi empirique qui prédit que la complexité (et donc la puissance de calcul) des processeurs double tous les 12 à 18 mois. Depuis l'avènement de l'informatique moderne, la vitesse d'évolution des processeurs n'a pu outrepasser les prévisions de la loi de Moore. Pour souligner l'évolution fulgurante du prix moyen de séquençage d'un génome, celle-ci est comparée à ce qu'elle serait si elle devait suivre la loi de Moore. Ainsi, le séquençage d'un génome devrait couter en moyenne près de 100 000 $ actuellement.

SOURCE : National Human Genome Research Institute, 2021

Un très bref *benchmarking* a été réalisé durant cette étude. L'assemblage du génome d'un dermatophyte (dont la taille est située entre 20 et 25 mégabases) sur le logiciel WGST a nécessité en moyenne un peu plus de 7 heures. Pour ce qui est de la création du dendrogramme, l'analyse avec 60 souches a nécessité un peu plus de 48 heures. Dans la mesure où les analyses demandées dans le cadre d'une dermatophytose ne sont pas des analyses urgentes, ces délais sont tolérés. Cependant, il est possible de raccourcir fortement ce dernier en tirant parti de certaines évolutions informatiques. Parmi ces évolutions figure l'avènement des processeurs à architecture *RISC*, en théorie plus efficaces que leur homologues à architecture *CISC*. L'assemblage du génome réalisé par SPAdes sur une machine dotée d'une telle configuration matérielle (en l'occurrence, un processeur Apple Silicon M1) ne nécessite alors qu'une heure (soit 7 fois moins que WGST exécuté sur un serveur et 4 fois moins que SPAdes exécuté dans les mêmes conditions sur un processeur *CISC* équivalent, l'Intel Core i5). Des essais plus poussés sont néanmoins nécessaires pour confirmer ces observations. Une autre évolution du domaine a vu le jour au cours des deux dernières décennies : le détournement du circuit graphique pour la réalisation des calculs gourmands en ressources. Taillées pour le *parallel computing*, les cartes graphiques (ou GPU en anglais) permettent d'accélérer le traitement des données avec des facteurs jamais vus auparavant. En juin 2007, NVIDIA, leader du marché des circuits graphiques annonce l'arrivée de CUDA, sa plateforme de programmation de GPU. Véritable révolution dans le domaine, il faudra néanmoins attendre quelques années pour voir apparaître les premiers programmes bio-informatiques qui tirent profit de cette avancée. C'est le cas de LaSAGNA (**Goswami et al., 2018**), un outil d'assemblage *de novo* ou encore GASAL2, un outil d'alignement de séquence (**Ahmed et al., 2019**). Ces évolutions ont également un impact favorable sur le coût du NGS, puisqu'une carte graphique se négocie à des tarifs sensiblement plus faibles qu'un serveur de calcul tout en promettant des performances au pire égales, et au mieux largement supérieures. En pratique, ceci est à nuancer selon le domaine d'étude. L'assemblage d'un génome humain nécessitant des ressources beaucoup plus conséquentes que l'assemblage du génome d'un dermatophyte, l'utilisation de programmes accélérés par GPU aura un impact plus soutenu dans le premier domaine par rapport au second. Les résultats obtenus par le séquençage à haut-débit appliqué aux dermatophytes sont très encourageants et ont montré qu'une seule technique peut remplacer l'identification, la caractérisation de la résistance à la terbinafine ainsi que le typage moléculaire. Par ailleurs, aucune technique n'offre un champ d'action aussi large que le séquençage du génome. L'acquisition d'un séquenceur de troisième génération pourrait être envisagée à l'avenir. Bien plus qu'un simple achat, c'est tout un changement de paradigme qui accompagnera ce dispositif et permettra au CNRML de prendre son indépendance vis-à-vis des services externes pour ce qui est du séquençage du génome.

5.5. Analyse des marqueurs

L'étape suivante du processus permet l'analyse des marqueurs présents au sein des génomes étudiés. Cette analyse a permis d'établir le profil majoritaire des dermatophytes du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. Par ailleurs, elle a également permis la caractérisation des mutations du gène SQLE. En excluant les 4 souches de référence résistantes de la collection BCCM/IHEM (déjà caractérisées au préalable), cette méthode a permis la détection de 4 souches présentant une mutation au sein de leur gène SQLE, dont 2 qui présentaient la mutation F397L et 2 qui présentaient la mutation L393F. La première détection de ce type de mutation en Belgique est très récente, puisqu'elle a eu lieu il y'a seulement deux ans (**Sacheli et al., 2020**). Les autres pays d'Europe ne sont pas en reste, puisque des mutations du gène SQLE ont également été détectées en Suisse (**Yamada et al., 2017**), en Pologne (**Lagowski et al., 2020**), au Danemark (**Saunte et al., 2020**), en France (**Moreno-Sabater et al., 2022**) ou encore en Allemagne (**Süß et al., 2019**). Curieusement, la souche KE028, bien que caractérisée comme étant résistante à la terbinafine tant par la méthode de *screening* que par la méthode de référence ne présente aucune des 4 mutations ciblées par WGST au sein du gène SQLE. Face à cette observation, il a été décidé de procéder à une recherche manuelle et ce, pour tous les génomes étudiés. La manipulation bio-informatique a permis de mettre en évidence la mutation K276N au sein de 37% des souches de l'échantillon, y compris celui de la souche KE028. Curieusement, cette mutation apparait exclusivement au sein de la SQLE de *T. mentagrophytes*. Face à ce résultat, il peut être spéculé que les SQLE de *T. mentagrophytes* sont distinctes des SQLE de *T. interdigitale* et *T. indotineae*. A nouveau, l'utilité d'un séquençage du génome est démontrée ici. En pratique, il est possible d'obtenir la séquence du gène SQLE grâce à une amplification par PCR suivie d'un séquençage selon la méthode Sanger. Cependant, cette analyse n'est souvent réalisée que pour les dermatophytes qui montrent une résistance à la terbinafine. Hormis ce cas, il n'y a aucune raison qui justifie le séquençage du gène SQLE. Sans l'étude du génome telle qu'elle a été réalisée ici, les chances de détecter des mutations telles que la mutation K276N sont très faibles. Ainsi, le séquençage du génome contribue directement à approfondir les connaissances de la communauté scientifique vis-à-vis des dermatophytes. Par ailleurs, la mutation K276N a également été détectée dans une étude parue l'an passé (**Kong et al., 2021**). Des investigations plus récentes ont permis de conclure que cette mutation n'interfère pas avec la fonction de la SQLE puisqu'elle est détectée à la fois chez les souches sensibles et les souches résistantes à la terbinafine (**Dellière et al., 2022**). Ces observations ont été confirmées par la présente étude, puisque 21 des 22 souches présentant la mutation sont sensibles à la terbinafine. Concernant le profil résistant de la souche KE028, aucune explication n'a pu être avancée à ce stade étant donné que l'analyse de son gène SQLE ne révèle aucune mutation si ce n'est la K276N. Le cas d'un dermatophyte résistant à la terbinafine malgré un gène SQLE non-muté a déjà été rapporté par le passé (**Hiruma et al., 2019**).

Les auteurs de cette étude avaient alors émis l'hypothèse selon laquelle ce mécanisme de résistance serait médié par une surexpression des transporteurs ABC. Le fait que la souche KE028 soit résistante à l'itraconazole en plus de la terbinafine renforce cette idée. A l'heure actuelle, la mention des cas de résistance à la terbinafine non-médiés par une mutation au niveau du gène SQLE est très rare dans la littérature. Cependant, s'il s'avère que ces cas sont effectivement médiés par une surexpression des transporteurs ABC, le CNRML pourrait envisager à l'avenir le développement d'un *pipeline* d'analyse basé sur le séquençage à haut-débit de l'ARN. Les données qui en résultent pourraient être analysées par DESeq2, un outil d'analyse de l'expression génétique différentielle basé sur la distribution binomiale négative (*Love et al., 2014*). Cette approche devrait permettre de confirmer ou à l'inverse d'infirmer la surexpression des transporteurs ABC au sein de la souche KE028.

5.6. Identification des espèces

Pour ce qui est de l'identification, les méthodes actuellement mises en place par le CNRML permettent de distinguer efficacement les différentes espèces de dermatophytes rencontrés en pratique. Ces méthodes combinent l'analyse phénotypique à la biologie moléculaire (séquençage ITS2) afin d'identifier l'espèce incriminée. Cependant, pour les dermatophytes, cette approche se heurte à des difficultés d'identification au sein de 2 groupes. Le premier groupe est formé des espèces *T. rubrum/violaceum*. Comme démontré précédemment (***FIGURE 1.04***), une mesure d'*ANI* entre les génomes de référence de ces 2 espèces révèle qu'elles sont extrêmement proches l'une de l'autre (ANI = 99,24). Cette proximité a également été démontrée maintes fois dans la littérature (*Pchelin et al., 2018*). Le second groupe est formé des espèces *T. mentagrophytes / interdigitale /indotineae*. En pratique, un séquençage du segment ITS2 est réalisé afin de discriminer les espèces de ce complexe. Néanmoins, le CNRML est fréquemment confronté à un résultat discordant entre les informations cliniques et l'identification obtenue par cette méthode. Jusqu'à récemment, l'identification rendue dans ce contexte par le CNRML était « *T. mentagrophytes complexe* ». Lorsqu'il a fallu distinguer les espèces qui forment ce complexe à la suite de la reclassification des dermatophytes (*De Hoog et al., 2016*), des règles empiriques basées sur l'origine du prélèvement ont été mises en place (***FIGURE 5.02***) afin d'orienter le diagnostic. Ces règles ne servent en aucun cas à établir un diagnostic sans examen mycologique approfondi. Il s'agit ici d'orienter plus que d'établir l'identification *stricto sensu*. Ces lois sont basées sur l'expérience du CNRML pour l'identification des dermatophytes, mais ont également fait l'objet d'une description dans la littérature. Dans une récente étude du département de dermatologie de l'Hôpital Universitaire de Zurich (*Klinger et al., 2021*), les auteurs ont pu conclure à des différences notables entre *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale* à la suite d'une comparaison des régions ITS. La première espèce semble infecter des patients plus jeunes (médiane de 22 ans pour *T. mentagrophytes* contre 62 ans pour *T. interdigitale*) et majoritairement de sexe féminin (63% de femmes contre 40% d'hommes). Concernant la zone de prélèvement, *T. mentagrophytes* infecte rarement les pieds et jamais les ongles. A l'inverse, le *T. interdigitale* semble restreint aux zones proches des pieds et cause en majorité l'onychomycose. Les auteurs ont néanmoins relevé 4 exceptions à ceci : 2 cas de *T. interdigitale* palmoplantaires, 1 cas inguinal et 1 cas isolé à partir du cuir chevelu. Enfin, l'aspect des lésions a également son importance. Étant zoophile, le *T. mentagrophytes* a tendance à causer des lésions inflammatoires là où l'espèce anthropophile *T. interdigitale* a tendance à causer des lésions non ou peu inflammatoires. Par conséquent, le contact avec un animal oriente naturellement l'identification vers la suspicion d'un *T. mentagrophytes*. Les résultats obtenus lors de ce travail permettent de confirmer l'existence d'une tendance selon l'origine du prélèvement. Une exception existe cependant pour la peau du pied, puisque parmi les 4 dermatophytes prélevés sur une peau du pied, 3 n'étaient pas des *T. interdigitale*. Ces règles empiriques montrent ainsi une limite lorsqu'elles sont confrontées à la réalité, puisque des exceptions existent. L'idée d'inclure l'origine du prélèvement dans l'orientation du diagnostic n'est cependant pas dénuée de sens, comme cela a été montré dans la partie résultats de cette étude. Cela étant dit, il est nécessaire de mener une étude statistique à plus large échelle afin de déterminer l'étendue de ces exceptions. Actuellement, la DB utilisée par le CNRML pour l'identification des dermatophytes basée sur le séquençage du segment ITS2 est la DB du WI, principalement parce que les dépôts de séquences y sont beaucoup plus contrôlés que pour la DB du NCBI. Cependant, pour la distinction des espèces du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*, l'utilisation de la séquence ITS2 a montré une très faible résolution et ce, peu importe l'approche / DB utilisée. Ceci peut s'expliquer par la très faible taille de cette séquence.

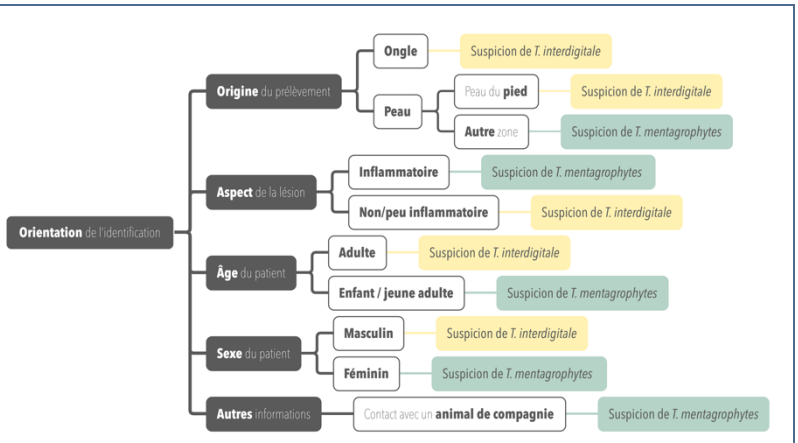


FIGURE 5.02. Orientation de l'identification selon les informations cliniques du patient

Ceci constitue une aide à l'identification et ne représente en aucun cas une vérité absolue. De nombreuses exceptions existent à ces règles. A titre d'exemple, *T. interdigitale* est en majorité restreint aux zones à proximité des pieds. Cependant, il arrive qu'un *T. interdigitale* soit identifié au sein d'un échantillon ayant été prélevé sur une autre zone.

Cette taille varie d'une espèce à l'autre. Pour les dermatophytes du complexe étudié, la taille de cette séquence est de 180 paires de bases. A titre de comparaison, les séquences ITS1 et TEF1a sont sensiblement plus longues (respectivement 254 et 690 paires de bases). Pour ce qui est de la séquence ITS1, l'efficacité de la DB du NCBI s'est révélée supérieure lorsqu'elle est comparée à celle de la DB du WI. Le défaut de cette dernière résulte justement de ce qui fait sa force : puisque les dépôts de séquences y sont fortement contrôlés, certaines espèces n'y sont que peu (voire pas du tout) représentées. C'est le cas de *T. indotineae*, espèce qui semble inexistante au sein de la DB du WI. Le corollaire de ceci est qu'il existe un équilibre pour le contrôle des dépôts de séquences au sein d'une DB : des conditions trop strictes mènent à un appauvrissement de cette dernière tandis qu'à l'inverse, des conditions trop peu strictes mènent à l'apparition de séquences peu ou mal caractérisées, ce qui induit *in fine* des erreurs d'identification. Les résultats de cette étude ont montré que pour une identification dépendante d'une DB, la séquence ITS1 combinée à la DB du NCBI donne les meilleurs scores en ce qui concerne le complexe *T.interdigitale/mentagrophytes/indotineae*. Fort du constat que les DB sont souvent incomplètes, deux approches indépendantes d'une quelconque DB ont été développées durant cette étude. La première consiste à construire un dendrogramme à l'aide de séquences de référence. Cette méthode a été décrite dans la littérature comme étant le moyen le plus efficace pour la discrimination des espèces du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* (*Pchelin et al., 2018*). Pour cette méthode, la séquence TEF1a a permis une identification identique à 100% à celle obtenue par le séquençage du génome. En juin 2021, une équipe de chercheur de l'Université Tarbiat Modares à Téhéran (Iran) est arrivée à la conclusion que le gène TEF1a figure parmi les gènes les plus informatifs quant à la discrimination des espèces *T. interdigitale* et *T. mentagrophytes* (*Salehi et al., 2021*). Ce résultat est confirmé par la présente étude. Beaucoup plus précise que la séquence ITS2, la séquence TEF1a peut faire l'objet à l'avenir d'une évaluation plus approfondie pour le remplacement de la procédure actuelle d'identification (basée sur la séquence ITS2 combinée à la DB du WI), du moins en ce qui concerne *T.interdigitale/mentagrophytes/indotineae*. La seconde approche nécessite un séquençage du génome. Elle consiste à mesurer l'ANI entre le génome étudié et un génome de référence. Pour cette méthode, un *cut-off* a été décrit dans la littérature (*Figueras et al., 2014*) : 2 génomes sont considérés comme appartenant à la même espèce si la valeur d'ANI mesurée est supérieure à 95%. Ceci constitue la principale limite de la méthode, puisqu'une comparaison des génomes de référence des 3 espèces du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* révèle des valeurs d'ANI supérieures à 99%. La question qui peut alors se poser est la suivante : la faible différence d'ANI suffit-elle à distinguer les espèces ? Une étude plus récente ajoute 2 valeurs au *cut-off* précédemment défini (*Jain et al., 2018*). Ainsi, une valeur d'ANI inférieure à 90% indique que les 2 génomes étudiés appartiennent à 2 espèces éloignées tandis qu'une valeur d'ANI supérieure à 99,5% indique que les 2 génomes étudiés sont fortement apparentés. L'approche exploitée ici fait en quelques sortes abstraction de ces valeurs seuil, puisque seule la valeur maximale d'ANI est retenue. Les résultats obtenus en procédant ainsi correspondent à ceux obtenus grâce au dendrogramme généré par WGST (à une exception près), démontrant par ailleurs la validité de cette approche. A nouveau, le lecteur peut s'interroger sur les raisons qui justifient le développement de cette approche. La réponse est purement pratique : le dendrogramme, bien qu'il soit facilement interprétable par l'œil humain, s'avère difficilement interprétable par un ordinateur. A l'inverse, une valeur quantitative comme l'ANI est facilement interprétable par un ordinateur. Ceci ouvre la porte à l'implémentation d'une nouvelle fonction au sein de WGST. Une fois le génome assemblé, ce dernier pourrait calculer l'ANI contre de multiples génomes de référence afin de déterminer, grâce à la valeur maximale, l'identification de l'espèce à laquelle le génome appartient.

5.7. Concordance entre les résultats du *screening* et ceux de l'identification

Concernant les dermatophytes résistants à la terbinafine, il s'est avéré que ceux-ci forment un clade distinct des *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale* (à l'exception de la souche KE028, classée dans le clade *T. mentagrophytes*). Après des analyses plus poussées, les souches de ce clade ont été identifiées comme appartenant à une espèce récemment définie : *T. indotineae*. Sur les 60 souches étudiées, 12 souches de *T. indotineae* ont été identifiées, ce qui représente 20% de l'échantillon étudié. En excluant les souches de référence de la collection BCCM/IHEM (6 souches au total), ceci laisse 6 isolats appartenant à cette espèce. Parmi ces 6 isolats, 4 se sont avérés résistants à la terbinafine. Au sein des *T. indotineae* étudiés, la fréquence de souches résistantes à la terbinafine est donc extrêmement élevée (67%). Ceci amène la généralité suivante : la majorité des souches de l'échantillon étudié qui sont résistantes à la terbinafine sont des *T. indotineae*, mais tous les *T. indotineae* ne sont pas résistants à la terbinafine. Ceci a déjà été observé auparavant dans une étude parue l'an dernier (*Kong et al., 2021*). A l'instar de la présente étude, celle-ci avait pour but d'étudier la sensibilité à la terbinafine au sein des dermatophytes du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. Les auteurs ont ainsi pu détecter 34 isolats résistants à la terbinafine parmi les 64 *T. indotineae* que comptait l'échantillon étudié. La fréquence des souches résistantes au sein de cette espèce semble assez proche de celle qui a pu être établie dans cette étude (53% contre 67% pour l'étude du CNRML).

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

6.1. Conclusions

L'étude des dermatophytes par séquençage à haut-débit nécessite de nombreuses mises au point, que ce soit au niveau de la mise en culture ou encore de l'extraction d'ADN. Cependant, cette approche novatrice s'est avérée très prometteuse étant donné les résultats qu'elle a générés. L'utilisation du séquençage à haut-débit couplé à l'outil bio-informatique d'Hedera-22 a permis la détection efficace des souches résistantes à la terbinafine. Des analyses plus poussées ont été menées sur ces souches afin d'en identifier l'espèce. Les résultats ont montré que la majorité de ces souches résistantes appartiennent à l'espèce *T. indotineae*. Il est cependant intéressant de noter que parmi les 12 dermatophytes classés comme *T. indotineae*, 2 souches (KE021 et KE040) n'ont pas de mutations au sein du gène de la SQLE et présentent un profil sensible à la terbinafine. Sans une étude génomique, ces 2 souches n'auraient jamais été caractérisées comme *T. indotineae* et seraient passées inaperçues. Ceci souligne l'avantage de cette approche. Par ailleurs, cette étude rétrospective a permis d'établir que des souches de l'espèce *T. indotineae* circulent en Belgique depuis 2018 au moins et ce, même si cette espèce n'a été définie qu'en 2020 (*Kano et al., 2020*).

Concernant la distinction des espèces qui forment le complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*, l'étude menée sur les séquences extraites des génomes assemblés a révélé pourquoi l'identification basée sur la séquence ITS2 couplée à la DB du WI peine tant à les distinguer. Par ailleurs, 2 alternatives à cette procédure ont été proposées : l'une consiste à aligner la séquence ITS1 au sein de la DB du NCBI (donne un taux d'identification correcte de 98,33%) tandis que l'autre consiste à construire un dendrogramme sur base des séquences TEF1a. Cette dernière méthode permet un taux d'identification correcte de 100% équivalente à l'identification basée sur l'entièreté du génome chez les dermatophytes. La distinction de ces espèces a son importance d'un point de vue clinique. Comme abordé précédemment, des différences notables existent entre ces dernières : *T. interdigitale* est exclusivement anthropophile et ne cause pas de lésions inflammatoires là où *T. mentagrophytes/indotineae* sont zoophiles et ont tendance à causer des lésions à bords inflammatoires. De plus, en fonction de l'espèce, un certain tropisme semble se confirmer en termes de localisation du tissu lésé. Puisque l'identification de l'espèce incriminée conditionne le choix du traitement (et de son mode d'administration, topique et/ou systémique) et que le choix du traitement conditionne lui-même le succès d'une thérapie antifongique, la bonne identification de l'espèce est d'une importance capitale. Ceci est d'autant plus vrai lorsque le taux de souches résistantes au sein de l'espèce *T. indotineae* est considéré. Cette étude (et celles menées par d'autres auteurs) ont servi à confirmer un taux très élevé de souches résistantes à la terbinafine, occasionnant par ailleurs des échecs thérapeutiques plus fréquents par rapport aux 2 autres espèces du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. La bonne identification de cette espèce permettra une meilleure prise en charge des patients ainsi qu'une thérapie plus adaptée.

6.2. Perspectives

Cette étude a permis de mettre en évidence les lacunes de la méthode actuellement utilisée par le CNRML (séquençage ITS2 combiné à WI DB) pour l'identification et la distinction des dermatophytes. Dans les faits, cette approche est efficace pour les champignons dans leur globalité, mais elle manque de résolution pour les dermatophytes du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae*. A l'avenir, il pourrait être envisagé d'étudier davantage l'approche mise au point au sein de ce travail (séquençage TEF1a combiné à la construction d'un dendrogramme avec séquences de référence). Le but à long terme serait d'adapter la procédure actuelle d'identification. La nouvelle procédure serait la suivante : après un examen au microscope, si un dermatophytes du complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* est suspecté, un séquençage TEF1a est réalisé. Dans le cas contraire, la procédure habituelle est appliquée et le segment ITS2 est séquencé.

Par ailleurs, une étude nationale à large échelle a été lancée par le CNRML en avril 2022. L'étude en cours et celle qui a été réalisée durant ce travail sont interconnectées : les mises au point effectuées ici serviront à l'étude en cours tandis que les résultats générés par l'étude en cours serviront à préciser ceux obtenus ici (à titre rétrospectif). L'hypothèse du CNRML à ce niveau est qu'à l'instar d'autres pays à travers le monde, la Belgique connaît actuellement une augmentation de cas de *T. indotineae*, espèce récemment définie au sein de laquelle la fréquence des souches résistantes à la terbinafine est élevée. Si cette hypothèse est vérifiée à large échelle (ce que permettra l'étude nationale en cours), de nouvelles *guidelines* pourraient être transmises aux différents laboratoires du pays afin de systématiser le *screening* des dermatophytes. Pour remplir cette tâche, la méthode de *screening* en plaques telle qu'elle a été utilisée ici s'avère être un candidat idéal.

BIBLIOGRAPHIE

A

Afgan, E., Nekrutenko, A., Grüning, B. A., Blankenberg, D., Goecks, J., Schatz, M. C., Ostrovsky, A. E., Mahmoud, A., Lonie, A. J., Syme, A., Fouilloux, A., Bretaudeau, A., Nekrutenko, A., Kumar, A., Eschenlauer, A. C., DeSanto, A. D., Guerler, A., Serrano-Solano, B., Batut, B., … Briggs, P. J. (2022). The Galaxy platform for accessible, reproducible and collaborative biomedical analyses: 2022 update. Nucleic Acids Research. https://doi.org/10.1093/nar/gkac247

Ahmed, N., Lévy, J., Ren, S., Mushtaq, H., Bertels, K., & Al-Ars, Z. (2019). GASAL2: a GPU accelerated sequence alignment library for high-throughput NGS data. BMC Bioinformatics, 20(1), 520. https://doi.org/10.1186/s12859-019-3086-9

Akhoundi, M., Marteau, A., Brun, S., & Izri, A. (2020). *Atypical extensive tinea corporis caused by Trichophyton tonsurans*. International Journal of Infectious Diseases, 97, 180–181. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2020.05.116

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., & Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. Journal of Molecular Biology, 215(3), 403–410. https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2

Ameen, M. (2010). Epidemiology of superficial fungal infections. Clinics in Dermatology, 28(2), 197–201. https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.005

Anaconda LTD. (2016). Anaconda. Available online at : https://anaconda.org

Andrews, S. (2010). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. Available online at: http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc

Araiza-Santibáñez, J., Tirado-Sánchez, A., González-Rodríguez, A. L., Vázquez-Escorcia, L., Ponce-Olivera, R. M., & Bonifaz, A. (2015). Onychomycosis in the elderly. A 2-year retrospective study of 138 cases. Revista Médica Del Hospital General de México, 79(1), 5–10. https://doi.org/10.1016/j.hgmx.2015.10.004

Arendrup, M. C., Kahlmeter, G., Guinea, J., & Meletiadis, J. (2021). How to: perform antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes following the new reference EUCAST method E.Def 11.0, exemplified by Trichophyton. Clinical Microbiology and Infection, 27(1), 55–60. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.08.042

ANOFEL (association française des enseignants de parasitologie et mycologie). (2016). Introduction à la mycologie. http://campus.cerimes.fr/parasitologie/enseignement/mycologie/site/html/1.html

Auguie, B. (2017). gridExtra: Miscellaneous Functions for "Grid" Graphics.

B

Baldo, A., Mathy, A., Tabart, J., Camponova, P., Vermout, S., Massart, L., Maréchal, F., Galleni, M., & Mignon, B. (2010). Secreted subtilisin Sub3 from Microsporum canis is required for adherence to but not for invasion of the epidermis. British Journal of Dermatology, 162(5), 990–997. https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2009.09608.x

Barbé, J., Clerc, G., & Bonhomme, A. (2018). Granulome de Majocchi pubien : une entité clinique de localisation inhabituelle. Annales de Dermatologie et de Vénéréologie, 145(12), S287–S288. https://doi.org/10.1016/j.annder.2018.09.459

Baudraz-Rosselet, F., Monod, M., Jaccoud, S., & Frenk, E. (1996). Efficacy of terbinafine treatment of tinea capitis in children varies according to the dermatophyte species. British Journal of Dermatology, 135(6), 1011–1012. https://doi.org/10.1046/j.1365-2133.1996.d01-1117.x

BCCM (Belgian Coordinated Collections of Microorganisms). (2022). BCCM/IHEM Fungi Collection: Human & Animal Health. https://bccm.belspo.be/about-us/bccm-ihem

Bengtsson-Palme, J., Ryberg, M., Hartmann, M., Branco, S., Wang, Z., Godhe, A., de Wit, P., Sánchez-García, M., Ebersberger, I., de Sousa, F., Amend, A. S., Jumpponen, A., Unterseher, M., Kristiansson, E., Abarenkov, K., Bertrand, Y. J. K., Sanli, K., Eriksson, K. M., Vik, U., … Nilsson, R. H. (2013). Improved software detection and extraction of ITS1 and ITS2 from ribosomal ITS sequences of fungi and other eukaryotes for analysis of environmental sequencing data. Methods in Ecology and Evolution, n/a-n/a. https://doi.org/10.1111/2041-210X.12073

Bentley, D. R. (2006). Whole-genome re-sequencing. Current Opinion in Genetics & Development, 16(6), 545–552. https://doi.org/10.1016/j.gde.2006.10.009

Bernard, F. (2021). Investigation of Caenorhabditis elegans transcriptome using nanopore-based sequencing technology.

Bir, N., Paliwal, A., Muralidhar, K., Reddy, P., & Sarma, P. U. (1995). A Rapid Method for the Isolation of Genomic DNA From Aspergillus Fumigatus. Preparative Biochemistry, 25(4), 171–181. https://doi.org/10.1080/10826069508010119

Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics, 30(15), 2114–2120. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170

Boudghene Stambouli, O., Amrani, N., Boudghéne Stambouli, K., & Bouali, F. (2017). Dermatophytic disease with deficit in CARD9: A new case with a brain impairment. Journal de Mycologie Médicale, 27(2), 250–253. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2017.01.001

Burmester, A., Hipler, U., Uhrlaß, S., Nenoff, P., Singal, A., Verma, S. B., Elsner, P., & Wiegand, C. (2020). Indian Trichophyton mentagrophytes squalene epoxidase erg1 double mutants show high proportion of combined fluconazole and terbinafine resistance. Mycoses, 63(11), 1175–1180. https://doi.org/10.1111/myc.13150

C

Calixto, G., Bernegossi, J., de Freitas, L., Fontana, C., & Chorilli, M. (2016). Nanotechnology-Based Drug Delivery Systems for Photodynamic Therapy of Cancer: A Review. Molecules, 21(3), 342. https://doi.org/10.3390/molecules21030342

Chabasse, D. (2008). Les dermatophytes : d'où viennent-ils? Comment sont-ils devenus des parasites? Journal de Mycologie Médicale, 18(1), 27–35. https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2007.12.002

Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). fastp: an ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. Bioinformatics, 34(17), i884–i890. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560

D

Dellière, S., Joannard, B., Benderdouche, M., Mingui, A., Gits-Muselli, M., Hamane, S., Alanio, A., Petit, A., Gabison, G., Bagot, M., & Bretagne, S. (2022). Emergence of Difficult-to-Treat Tinea Corporis Caused by Trichophyton mentagrophytes Complex Isolates, Paris, France. Emerging Infectious Diseases, 28(1), 224–228. https://doi.org/10.3201/eid2801.210810

De Hoog, G. S., Bowman, B., Graser, Y., Haase, G., el Fari, M., Gerrits van den Ende, A. H., Melzer-Krick, B., & Untereiner, W. A. (1998). Molecular phylogeny and taxonomy of medically important fungi. Medical Mycology, 36 Suppl 1, 52–56.

De Hoog, G. S., Dukik, K., Monod, M., Packeu, A., Stubbe, D., Hendrickx, M., Kupsch, C., Stielow, J. B., Freeke, J., Göker, M., Rezaei-Matehkolaei, A., Mirhendi, H., & Gräser, Y. (2016). Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. Mycopathologia, 182(1–2), 5–31. https://doi.org/10.1007/s11046-016-0073-9

De Hoog, G., Guarro, J., Gené, J., Ahmed, S., Al-Hatmi, A., Figueras, M., & Vitale, R. (2020). Atlas of Clinical Fungi (4th ed.). Hilversum.

De Hoog, S., Tao, C., Kong, X., Kandemir, H., & Jiang, Y. (2021). Introduction to dermatophytes. In Dermatophytes and dermatophytoses (1st ed., pp. 3–11). Springer.

Descy, J., Meex, C., Melin, P., Hayette, M. P., Huynen, P., & de Mol, P. (2010). MALDI-TOF mass spectrometry in clinical bacteriology or how to identify a bacteria within one minute. Revue Medicale De Liege, 65 Spec no., 29–34.

Deutsch, P. (1996). GZIP file format specification version 4.3. https://doi.org/10.17487/rfc1952

Dorado, G., Gálvez, S., Budak, H., Unver, T., & Hernández, P. (2019). Nucleic-Acid Sequencing. In Encyclopedia of Biomedical Engineering (pp. 443–460). Elsevier. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.08998-4

Drmanac, R., Sparks, A. B., Callow, M. J., Halpern, A. L., Burns, N. L., Kermani, B. G., Carnevali, P., Nazarenko, I., Nilsen, G. B., Yeung, G., Dahl, F., Fernandez, A., Staker, B., Pant, K. P., Baccash, J., Borcherding, A. P., Brownley, A., Cedeno, R., Chen, L., … Reid, C. A. (2010). Human Genome Sequencing Using Unchained Base Reads on Self-Assembling DNA Nanoarrays. Science, 327(5961), 78–81. https://doi.org/10.1126/science.1181498

E

Ebert, A., Monod, M., Salamin, K., Burmester, A., Uhrlaß, S., Wiegand, C., Hipler, U., Krüger, C., Koch, D., Wittig, F., Verma, S. B., Singal, A., Gupta, S., Vasani, R., Saraswat, A., Madhu, R., Panda, S., Das, A., Kura, M. M., … Nenoff, P. (2020). Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study. Mycoses, 63(7), 717–728. https://doi.org/10.1111/myc.13091

Edler, D., Klein, J., Antonelli, A., & Silvestro, D. (2021). raxmlGUI 2.0: A graphical interface and toolkit for phylogenetic analyses using RAxML. Methods in Ecology and Evolution, 12(2), 373–377. https://doi.org/10.1111/2041-210X.13512

Egrek, S. (2020). Evaluation du séquençage à haut débit (NGS) combiné à un outil bio-informatique pour la caractérisation complète de l'infection au streptococcus agalactiae et le remplacement des méthodes actuellement utilisées par le laboratoire.

Eid, J., Fehr, A., Gray, J., Luong, K., Lyle, J., Otto, G., Peluso, P., Rank, D., Baybayan, P., Bettman, B., Bibillo, A., Bjornson, K., Chaudhuri, B., Christians, F., Cicero, R., Clark, S., Dalal, R., deWinter, A., Dixon, J., … Turner, S. (2009). Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. Science, 323(5910), 133–138. https://doi.org/10.1126/science.1162986

Emmons, C. W. (1934). Dermatophytes : natural grouping based on the form of the spores and accessory organs. Archives of Dermatology and Syphilology, 30(3), 337. https://doi.org/10.1001/archderm.1934.01460150003001

Etcheverria, C. (2022). Les dermatophytes: à propos des espèces isolées au CHU de Bordeaux (2014-2020) et actualités taxonomiques, diagnostiques et thérapeutiques.

Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. Bioinformatics, 32(19), 3047–3048. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354

Ewing, B., & Green, P. (1998). Base-Calling of Automated Sequencer Traces Using Phred: Error Probabilities. Genome Research, 8(3), 186–194. https://doi.org/10.1101/gr.8.3.186

F

Faul, F., Erdfelder, E., Lang, A.-G., & Buchner, A. (2007). G*Power 3: A flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. Behavior Research Methods, 39(2), 175–191. https://doi.org/10.3758/BF03193146

Ferrer, C., Colom, F., Frasés, S., Mulet, E., Abad, J. L., & Alió, J. L. (2001). Detection and Identification of Fungal Pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S Ribosomal DNA Typing in Ocular Infections. Journal of Clinical Microbiology, 39(8), 2873–2879. https://doi.org/10.1128/JCM.39.8.2873-2879.2001

Figueras, M. J., Beaz-Hidalgo, R., Hossain, M. J., & Liles, M. R. (2014). Taxonomic affiliation of new genomes should be verified using average nucleotide identity and multilocus phylogenetic analysis. Genome Announcements, 2(6). https://doi.org/10.1128/genomeA.00927-14

Fourment, M., & Holmes, E. C. (2016). Seqotron: a user-friendly sequence editor for Mac OS X. BMC Research Notes, 9(1), 106. https://doi.org/10.1186/s13104-016-1927-4

G

Garnier, S., Ross, N., Rudis, R., Camargo, A., Sciaini, M., & Scherer, C. (2021). Rvision : Colorblind-Friendly Color Maps for R.

Ghannoum, M. A., & Isham, N. C. (2009). Dermatophytes and dermatophytoses. In Clinical mycology (2nd ed., pp. 375–384). Elsevier.

Gits-Muselli, M., Benderdouche, M., Hamane, S., Mingui, A., Feuilhade de Chauvin, M., Guigue, N., Picat, M.-Q., Bourrat, E., Petit, A., Bagot, M., Alanio, A., & Bretagne, S. (2016). Continuous increase of Trichophyton tonsurans as a cause of tinea capitis in the urban area of Paris, France: a 5-year-long study. Medical Mycology, myw107. https://doi.org/10.1093/mmy/myw107

Goswami, S., Lee, K., Shams, S., & Park, S.-J. (2018). GPU-Accelerated Large-Scale Genome Assembly. 2018 IEEE International Parallel and Distributed Processing Symposium (IPDPS), 814–824. https://doi.org/10.1109/IPDPS.2018.00091

Gouters, M. (2021). Caractérisation phénotypique et moléculaire de la résistance des dermatophytes à la terbinafine et évaluation du kit PCR multiplex en temps réel « DermaGenius® Resistance ».

Graser, Y., Kuijpers, A. F. A., Presber, W., & de Hoog, G. S. (1999). Molecular taxonomy of Trichophyton mentagrophytes and T. tonsurans. Medical Mycology, 37(5), 315–330. https://doi.org/10.1046/j.1365-280X.1999.00234.x

Griekspoor, A., & Groothuis, T. (2004). 4Peaks.

Gupta, A. K., Venkataraman, M., & Quinlan, E. M. (2017). New Antifungal Agents and New Formulations Against Dermatophytes. In Dermatophytes and Dermatophytoses (pp. 433–471). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67421-2_21

Gupta, A. K., Venkataraman, M., & Quinlan, E. M. (2017). Onychomycosis in the Twenty-First Century: An Update on Epidemiology and Diagnosis. In Dermatophytes and Dermatophytoses (pp. 41–64). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67421-2_3

Gupta, A. K., & Stec, N. (2019). Emerging drugs for the treatment of onychomycosis. Expert Opinion on Emerging Drugs, 24(4), 213–220. https://doi.org/10.1080/14728214.2019.1685493

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N., & Tesler, G. (2013). QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. Bioinformatics, 29(8), 1072–1075. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086

H

Harris, T. D., Buzby, P. R., Babcock, H., Beer, E., Bowers, J., Braslavsky, I., Causey, M., Colonell, J., DiMeo, J., Efcavitch, J. W., Giladi, E., Gill, J., Healy, J., Jarosz, M., Lapen, D., Moulton, K., Quake, S. R., Steinmann, K., Thayer, E., … Xie, Z. (2008). Single-Molecule DNA Sequencing of a Viral Genome. Science, 320(5872), 106–109. https://doi.org/10.1126/science.1150427

Hayette, M.-P., & Sacheli, R. (2017). Unusual Species of Dermatophytes: Rarely Identified or New? Mycopathologia, 182(1–2), 203–213. https://doi.org/10.1007/s11046-016-0066-8

Hayette, M.-P., Seidel, L., Adjetey, C., Darfouf, R., Wéry, M., Boreux, R., Sacheli, R., Melin, P., & Arrese, J. (2019). Clinical evaluation of the DermaGenius® Nail real-time PCR assay for the detection of dermatophytes and Candida albicans in nails. Medical Mycology, 57(3), 277–283. https://doi.org/10.1093/mmy/myy020

Havlickova, B., Czaika, V. A., & Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. Mycoses, 51, 2–15. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x

Hedera-22 (2020). WGS Typer.

Hiruma, J., Kitagawa, H., Noguchi, H., Kano, R., Hiruma, M., Kamata, H., & Harada, K. (2019). Terbinafine-resistant strain of Trichophyton interdigitale strain isolated from a tinea pedis patient. The Journal of Dermatology, 46(4), 351–353. https://doi.org/10.1111/1346-8138.14809

Hiruma, J., Noguchi, H., Hase, M., Tokuhisa, Y., Shimizu, T., Ogawa, T., Hiruma, M., Harada, K., & Kano, R. (2020). Epidemiological study of terbinafine-resistant dermatophytes isolated from Japanese patients. The Journal of Dermatology, 48(4), 564–567. https://doi.org/10.1111/1346-8138.15745

Horisawa, S., Sakuma, Y., & Doi, S. (2009). Qualitative and quantitative PCR methods using species-specific primer for detection and identification of wood rot fungi. Journal of Wood Science, 55(2), 133–138. https://doi.org/10.1007/s10086-008-1011-3

Howell, M. (2009). Homebrew package manager

I

Illumina Cambridge Ltd. (formerly Solexa Ltd.). (2011). Illumina's quality score encoding (1.8+). Available online at : https://support.illumina.com/help/BaseSpace_OLH_009008/Content/Source/Informatics/BS/QualityScoreEncoding_swBS.html

Illumina Cambridge Ltd. (formerly Solexa Ltd.). (2020). Trousse de préparation Illumina DNA sans amplification en chaîne par polymérase (PCR), tagmentation.

Irinyi, L., Serena, C., Garcia-Hermoso, D., Arabatzis, M., Desnos-Ollivier, M., Vu, D., Cardinali, G., Arthur, I., Normand, A.-C., Giraldo, A., da Cunha, K. C., Sandoval-Denis, M., Hendrickx, M., Nishikaku, A. S., de Azevedo Melo, A. S., Merseguel, K. B., Khan, A., Parente Rocha, J. A., Sampaio, P., … Meyer, W. (2015). International Society of Human and Animal Mycology (ISHAM)-ITS reference DNA barcoding database--the quality controlled standard tool for routine identification of human and animal pathogenic fungi. Medical Mycology, 53(4), 313–337. https://doi.org/10.1093/mmy/myv008

J

Jain, C., Rodriguez-R, L. M., Phillippy, A. M., Konstantinidis, K. T., & Aluru, S. (2018). High throughput ANI analysis of 90K prokaryotic genomes reveals clear species boundaries. Nature Communications, 9(1), 5114. https://doi.org/10.1038/s41467-018-07641-9

Jackman, S. D., Vandervalk, B. P., Mohamadi, H., Chu, J., Yeo, S., Hammond, S. A., Jahesh, G., Khan, H., Coombe, L., Warren, R. L., & Birol, I. (2017). ABySS 2.0: resource-efficient assembly of large genomes using a Bloom filter. Genome Research, 27(5), 768–777. https://doi.org/10.1101/gr.214346.116

JetBrains. (2017). PyCharm IDE for Python. Available online at : https://www.jetbrains.com/pycharm/

K

Kano, R. (2021). ATP-binding Cassette (ABC) Transporter Proteins in Highly Terbinafine-resistant Strains of *Trichophyton indotineae* (Former Species Name: *Trichophyton interdigitale*). Medical Mycology Journal, 62(1), 21–25. https://doi.org/10.3314/mmj.20-00014

Kano, R., Kimura, U., Kakurai, M., Hiruma, J., Kamata, H., Suga, Y., & Harada, K. (2020). Trichophyton indotineae sp. nov.: A New Highly Terbinafine-Resistant Anthropophilic Dermatophyte Species. Mycopathologia, 185(6), 947–958. https://doi.org/10.1007/s11046-020-00455-8

Kassambara, A. (2021). rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests.

Katoh, K. (2002). MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform. Nucleic Acids Research, 30(14), 3059–3066. https://doi.org/10.1093/nar/gkf436

Kaufman, G., Horwitz, B. A., Duek, L., Ullman, Y., & Berdicevsky, I. (2007). Infection stages of the dermatophyte pathogen Trichophyton : microscopic characterization and proteolytic enzymes. Medical Mycology, 45(2), 149–155. https://doi.org/10.1080/13693780601113618

Klinger, M., Theiler, M., & Bosshard, P. P. (2021). Epidemiological and clinical aspects of Trichophyton mentagrophytes/Trichophyton interdigitale infections in the Zurich area: a retrospective study using genotyping. Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV, 35(4), 1017–1025. https://doi.org/10.1111/jdv.17106

Klug, W. S., Cummings, M., Spencer, C., Palladino, M., & Darrell, K. (2020). Essentials of genetics (10th ed.). Pearson.

Komsta, L., & Novomestky, F. (2015). moments: Moments, cumulants, skewness, kurtosis and related tests.

Kong, X., Tang, C., Singh, A., Ahmed, S. A., Al-Hatmi, A. M. S., Chowdhary, A., Nenoff, P., Gräser, Y., Hainsworth, S., Zhan, P., Meis, J. F., Verweij, P. E., Liu, W., & de Hoog, G. S. (2021). Antifungal Susceptibility and Mutations in the Squalene Epoxidase Gene in Dermatophytes of the Trichophyton mentagrophytes Species Complex. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 65(8). https://doi.org/10.1128/AAC.00056-21

Kuhad, R. C., Kapoor, R. K., & Lal, R. (2004). Improving the yield and quality of DNA isolated from white-rot fungi. Folia Microbiologica, 49(2), 112–116. https://doi.org/10.1007/BF02931383

Kumar, M., & Mugunthan, M. (2017). Evaluation of three DNA extraction methods from fungal cultures. Medical Journal Armed Forces India, 74(4), 333–336. https://doi.org/10.1016/j.mjafi.2017.07.009

L

Łagowski, D., Gnat, S., Nowakiewicz, A., Osińska, M., & Dyląg, M. (2020). Intrinsic resistance to terbinafine among human and animal isolates of Trichophyton mentagrophytes related to amino acid substitution in the squalene epoxidase. Infection, 48(6), 889–897. https://doi.org/10.1007/s15010-020-01498-1

Lecointre, G., & Camus, G. (2007). La classification du vivant, mode d'emploi. https://planet-vie.ens.fr/thematiques/evolution/classification-phylogenie/la-classification-du-vivant-mode-d-emploi

Letunic, I., & Bork, P. (2007). Interactive Tree Of Life (iTOL): an online tool for phylogenetic tree display and annotation. Bioinformatics, 23(1), 127–128. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btl529

Li, D., Liu, C.-M., Luo, R., Sadakane, K., & Lam, T.-W. (2015). MEGAHIT: an ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. Bioinformatics, 31(10), 1674–1676. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btv033

Li, H., & Durbin, R. (2009). Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. Bioinformatics, 25(14), 1754–1760. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp324

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. Bioinformatics, 25(16), 2078–2079. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352

Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. Genome Biology, 15(12), 550. https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8

Luo, R., Liu, B., Xie, Y., Li, Z., Huang, W., Yuan, J., He, G., Chen, Y., Pan, Q., Liu, Y., Tang, J., Wu, G., Zhang, H., Shi, Y., Liu, Y., Yu, C., Wang, B., Lu, Y., Han, C., … Wang, J. (2012). SOAPdenovo2: an empirically improved memory-efficient short-read de novo assembler. GigaScience, 1(1), 18. https://doi.org/10.1186/2047-217X-1-18

M

Madigan, M. T., Martinko, J. M., & Brock, T. D. (2007). Biologie des micro-organismes (11th ed.). Pearson Education France.

Makimura, K., Tamura, Y., Mochizuki, T., Hasegawa, A., Tajiri, Y., Hanazawa, R., Uchida, K., Saito, H., & Yamaguchi, H. (1999). Phylogenetic classification and species identification of dermatophyte strains based on DNA sequences of nuclear ribosomal internal transcribed spacer 1 regions. Journal of Clinical Microbiology, 37(4), 920–924. https://doi.org/10.1128/JCM.37.4.920-924.1999

Mapelli, E. T. M., Cerri, A., Bombonato, C., & Menni, S. (2013). Tinea Capitis in the Paediatric Population in Milan, Italy: The Emergence of Trichophyton violaceum. Mycopathologia, 176(3–4), 243–246. https://doi.org/10.1007/s11046-013-9637-0

Margulies, M., Egholm, M., Altman, W. E., Attiya, S., Bader, J. S., Bemben, L. A., Berka, J., Braverman, M. S., Chen, Y.-J., Chen, Z., Dewell, S. B., Du, L., Fierro, J. M., Gomes, X. v., Godwin, B. C., He, W., Helgesen, S., Ho, C. H., Irzyk, G. P., … Rothberg, J. M. (2005). Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. Nature, 437(7057), 376–380. https://doi.org/10.1038/nature03959

Maxam, A. M., & Gilbert, W. (1977). A new method for sequencing DNA. Proceedings of the National Academy of Sciences, 74(2), 560–564. https://doi.org/10.1073/pnas.74.2.560

Mekkes, J. (2022). Tinea capitis (schimmel van het behaarde hoofd, hoofdschimmel). https://www.huidziekten.nl/zakboek/dermatosen/ttxt/TineaCapitis.htm

Metzker, M. L. (2010). Sequencing technologies – the next generation. Nature Reviews Genetics, 11(1), 31–46. https://doi.org/10.1038/nrg2626

Meyer, W., Irinyi, L., Hoang, M. T. V., Robert, V., Garcia-Hermoso, D., Desnos-Ollivier, M., Yurayart, C., Tsang, C.-C., Lee, C.-Y., Woo, P. C. Y., Pchelin, I. M., Uhrlaß, S., Nenoff, P., Chindamporn, A., Chen, S., Hebert, P. D. N., & Sorrell, T. C. (2018). Database establishment for the secondary fungal DNA barcode translational elongation factor 1α (TEF1α). Genome, 62(3), 160–169. https://doi.org/10.1139/gen-2018-0083

Microsoft Corporation. (2022). Microsoft Excel pour Mac. Retrieved from https://office.microsoft.com/excel

Mitra, R. D., Shendure, J., Olejnik, J., Edyta-Krzymanska-Olejnik, & Church, G. M. (2003). Fluorescent in situ sequencing on polymerase colonies. Analytical Biochemistry, 320(1), 55–65. https://doi.org/10.1016/S0003-2697(03)00291-4

Monod, M., Capoccia, S., Léchenne, B., Zaugg, C., Holdom, M., & Jousson, O. (2002). Secreted proteases from pathogenic fungi. International Journal of Medical Microbiology, 292(5–6), 405–419. https://doi.org/10.1078/1438-4221-00223

Monod, M., Feuermann, M., & Yamada, T. (2021). Terbinafine and Itraconazole Resistance in Dermatophytes. In Dermatophytes and Dermatophytoses (pp. 415–429). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67421-2_20

Moreno-Sabater, A., Normand, A.-C., Bidaud, A.-L., Cremer, G., Foulet, F., Brun, S., Bonnal, C., Aït-Ammar, N., Jabet, A., Ayachi, A., Piarroux, R., Botterel, F., Houzé, S., Desoubeaux, G., Hennequin, C., & Dannaoui, E. (2022). Terbinafine Resistance in Dermatophytes: A French Multicenter Prospective Study. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 8(3). https://doi.org/10.3390/jof8030220

Mukherjee, P. K., Leidich, S. D., Isham, N., Leitner, I., Ryder, N. S., & Ghannoum, M. A. (2003). Clinical Trichophyton rubrum Strain Exhibiting Primary Resistance to Terbinafine. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 47(1), 82–86. https://doi.org/10.1128/AAC.47.1.82-86.2003

N

National Human Genome Research Institute. (2021). The Cost of Sequencing a Human Genome. Available online at : https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Sequencing-Human-Genome-cost

New England BioLabs. (2022). Quick-Load® 100 bp DNA Ladder. Available online at : https://international.neb.com/products/n0467-quick-load-100-bp-dna-ladder#Product%20Information

Nikolenko, S. I., Korobeynikov, A. I., & Alekseyev, M. A. (2013). BayesHammer: Bayesian clustering for error correction in single-cell sequencing. BMC Genomics, 14(Suppl 1), S7. https://doi.org/10.1186/1471-2164-14-S1-S7

O

Ondov, B. D., Bergman, N. H., & Phillippy, A. M. (2011). Interactive metagenomic visualization in a Web browser. BMC Bioinformatics, 12(1), 385. https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-385

P

Patel, R. (2015). MALDI-TOF MS for the Diagnosis of Infectious Diseases. Clinical Chemistry, 61(1), 100–111. https://doi.org/10.1373/clinchem.2014.221770

Pashootan, N., Shams-Ghahfarokhi, M., Chaichi Nusrati, A., Salehi, Z., Asmar, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2022). Phylogeny, Antifungal Susceptibility, and Point Mutations of SQLE Gene in Major Pathogenic Dermatophytes Isolated From Clinical Dermatophytosis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 12. https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.851769

Pchelin, I. M., Azarov, D. v, Churina, M. A., Scherbak, S. G., Apalko, S. v, Vasilyeva, N. v, & Taraskina, A. E. (2018). Species boundaries in the Trichophyton mentagrophytes / T. interdigitale species complex. Medical Mycology, 57(6), 781–789. https://doi.org/10.1093/mmy/myy115

Prjibelski, A., Antipov, D., Meleshko, D., Lapidus, A., & Korobeynikov, A. (2020). Using SPAdes De Novo Assembler. Current Protocols in Bioinformatics, 70(1). https://doi.org/10.1002/cpbi.102

R

R Core Team (2021). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at : https://www.R-project.org/

Rivest, R. (1992). The MD5 Message-Digest Algorithm. https://doi.org/10.17487/rfc1321

Ronaghi, M., Uhlén, M., & Nyrén, P. (1998). A Sequencing Method Based on Real-Time Pyrophosphate. Science, 281(5375), 363–365. https://doi.org/10.1126/science.281.5375.363

Rothberg, J. M., Hinz, W., Rearick, T. M., Schultz, J., Mileski, W., Davey, M., Leamon, J. H., Johnson, K., Milgrew, M. J., Edwards, M., Hoon, J., Simons, J. F., Marran, D., Myers, J. W., Davidson, J. F., Branting, A., Nobile, J. R., Puc, B. P., Light, D., … Bustillo, J. (2011). An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. Nature, 475(7356), 348–352. https://doi.org/10.1038/nature10242

Rstudio Team. (2021). Rstudio: Integrated Development for R.

S

Sabouraud, R. (1910). Les teignes (1st ed.). Masson.

Sacheli, R., Adjetey, C., Darfouf, R., Harag, S., Huynen, P., Meex, C., Descy, J., Melin, P., Arrese, J., & Hayette, M.-P. (2016). A one-year survey of Microsporum audouinii infections in Belgium: epidemiological and genotypic characterization. Clinical Microbiology and Infection, 22(3), 285.e9-285.e17. https://doi.org/10.1016/j.cmi.2015.11.012

Sacheli, R., Cuypers, L., Seidel, L., Darfouf, R., Adjetey, C., Lagrou, K., & Hayette, M.-P. (2021). Epidemiology of Dermatophytes in Belgium: A 5 Years' Survey. Mycopathologia, 186(3), 399–409. https://doi.org/10.1007/s11046-021-00542-4

Sacheli, R., Harag, S., Dehavay, F., Evrard, S., Rousseaux, D., Adjetey, A., Seidel, L., Laffineur, K., Lagrou, K., & Hayette, M.-P. (2020). Belgian National Survey on Tinea Capitis: Epidemiological Considerations and Highlight of Terbinafine-Resistant T. mentagrophytes with a Mutation on SQLE Gene. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 6(4), E195. https://doi.org/10.3390/jof6040195

Sacheli, R., & Hayette, M.-P. (2018). Centre de référence mycoses : rapport d'activité 2018-2019.

Sacheli, R., & Hayette, M.-P. (2021). Antifungal Resistance in Dermatophytes: Genetic Considerations, Clinical Presentations and Alternative Therapies. Journal of Fungi, 7(11), 983. https://doi.org/10.3390/jof7110983

Sacheli, R., Henri, A., Seidel, L., Ernst, M., Darfouf, R., Adjetey, C., Schyns, M., Marechal, L., Meex, C., Arrese, J., & Hayette, M. (2020). Evaluation of the new Id-Fungi plates from Conidia for MALDI-TOF MS identification of filamentous fungi and comparison with conventional methods as identification tool for dermatophytes from nails, hair and skin samples. Mycoses, 63(10), 1115–1127. https://doi.org/10.1111/myc.13156

Salehi, Z., Shams-Ghahfarokhi, M., & Razzaghi-Abyaneh, M. (2021). Molecular Epidemiology, Genetic Diversity, and Antifungal Susceptibility of Major Pathogenic Dermatophytes Isolated From Human Dermatophytosis. Frontiers in Microbiology, 12, 643509. https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.643509

Sanger, F., & Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. Journal of Molecular Biology, 94(3), 441–448. https://doi.org/10.1016/0022-2836(75)90213-2

Saunte, D. M. L., Hare, R. K., Jørgensen, K. M., Jørgensen, R., Deleuran, M., Zachariae, C. O., Thomsen, S. F., Bjørnskov-Halkier, L., Kofoed, K., & Arendrup, M. C. (2020). Emerging Terbinafine Resistance in Trichophyton : Clinical Characteristics, Squalene Epoxidase Gene Mutations, and a Reliable EUCAST Method for Detection. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 63(10). https://doi.org/10.1128/AAC.01126-19

Schoch, C. L., Seifert, K. A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J. L., Levesque, C. A., Chen, W., Fungal Barcoding Consortium, & Fungal Barcoding Consortium Author List. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 109(16), 6241–6246. https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109

Schönlein, J. L. (1839). Zur Pathogenie der Impetigines. In Archiv für Anatomie und Physiologie (1st ed.).

Schutz, S. (2017). Le séquençage de nouvelle génération. Available online at : https://dridk.me/ngs.html

Seeman, T. (2018). Barrnap: rapid ribosomal RNA prediction.

Shen, J. J., Arendrup, M. C., Jemec, G. B. E., & Saunte, D. M. L. (2021). Photodynamic therapy: A treatment option for terbinafine resistant Trichophyton species. Photodiagnosis and Photodynamic Therapy, 33, 102169. https://doi.org/10.1016/j.pdpdt.2020.102169

Shendure, J., Porreca, G. J., Reppas, N. B., Lin, X., McCutcheon, J. P., Rosenbaum, A. M., Wang, M. D., Zhang, K., Mitra, R. D., & Church, G. M. (2005). Accurate Multiplex Polony Sequencing of an Evolved Bacterial Genome. Science, 309(5741), 1728–1732. https://doi.org/10.1126/science.1117389

Shi, Y., Niu, Q., Yu, X., Jia, X., Wang, J., Lin, D., & Jin, Y. (2015). Assessment of the function of SUB6 in the pathogenic dermatophyte Trichophyton mentagrophytes. Medical Mycology, myv071. https://doi.org/10.1093/mmy/myv071

Singh, A., Masih, A., Khurana, A., Singh, P. K., Gupta, M., Hagen, F., Meis, J. F., & Chowdhary, A. (2018). High terbinafine resistance in Trichophyton interdigitale isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. Mycoses, 61(7), 477–484. https://doi.org/10.1111/myc.12772

Siopi, M., Efstathiou, I., Theodoropoulos, K., Pournaras, S., & Meletiadis, J. (2021). Molecular Epidemiology and Antifungal Susceptibility of Trichophyton Isolates in Greece: Emergence of Terbinafine-Resistant Trichophytonmentagrophytes Type VIII Locally and Globally. Journal of Fungi (Basel, Switzerland), 7(6). https://doi.org/10.3390/jof7060419

Stamatakis, A. (2014). RAxML version 8: a tool for phylogenetic analysis and post-analysis of large phylogenies. Bioinformatics, 30(9), 1312–1313. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu033

Stringer, J. R., Beard, C. B., Miller, R. F., & Wakefield, A. E. (2002). A New Name for Pneumocystis from Humans and New Perspectives on the Host-Pathogen Relationship. Emerging Infectious Diseases, 8(9), 891–896. https://doi.org/10.3201/eid0809.020096

Stoddart, D., Heron, A. J., Klingelhoefer, J., Mikhailova, E., Maglia, G., & Bayley, H. (2010). Nucleobase Recognition in ssDNA at the Central Constriction of the α-Hemolysin Pore. Nano Letters, 10(9), 3633–3637. https://doi.org/10.1021/nl101955a

Süß, A., Uhrlaß, S., Ludes, A., Verma, S. B., Monod, M., Krüger, C., & Nenoff, P. (2019). Ausgeprägte Tinea corporis durch ein Terbinafin-resistentes Trichophyton-mentagrophytes-Isolat vom indischen Genotyp bei einem Säugling aus Bahrain in Deutschland. Der Hautarzt, 70(11), 888–896. https://doi.org/10.1007/s00105-019-4431-7

T

Takahata, S., Kubota, N., Takei-Masuda, N., Yamada, T., Maeda, M., Alshahni, M. M., Abe, S., Tabata, Y., & Maebashi, K. (2015). Mechanism of Action of ME1111, a Novel Antifungal Agent for Topical Treatment of Onychomycosis. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 60(2), 873–880. https://doi.org/10.1128/AAC.01790-15

Tang, C., Kong, X., Ahmed, S. A., Thakur, R., Chowdhary, A., Nenoff, P., Uhrlass, S., Verma, S. B., Meis, J. F., Kandemir, H., Kang, Y., & de Hoog, G. S. (2021). Taxonomy of the Trichophyton mentagrophytes/T. interdigitale Species Complex Harboring the Highly Virulent, Multiresistant Genotype T. indotineae. Mycopathologia, 186(3), 315–326. https://doi.org/10.1007/s11046-021-00544-2

The EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). (2022). Overview of antifungal ECOFFs and clinical breakpoints for yeasts, moulds and dermatophytes using the EUCAST E.Def 7.3, E.Def 9.4 and E.Def 11.0 procedures (v. 3).

V

Valouev, A., Ichikawa, J., Tonthat, T., Stuart, J., Ranade, S., Peckham, H., Zeng, K., Malek, J. A., Costa, G., McKernan, K., Sidow, A., Fire, A., & Johnson, S. M. (2008). A high-resolution, nucleosome position map of C. elegans reveals a lack of universal sequence-dictated positioning. Genome Research, 18(7), 1051–1063. https://doi.org/10.1101/gr.076463.108

Van Duyn Graham, L., & Elewski, B. E. (2011). Recent updates in oral terbinafine: its use in onychomycosis and tinea capitis in the US. Mycoses, 54(6), e679–e685. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2011.02038.x

Von Bubnoff, A. (2008). Next-Generation Sequencing: The Race Is On. Cell, 132(5), 721–723. https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.028

W

Walker, B. J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C. A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S. K., & Earl, A. M. (2014). Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. PLoS ONE, 9(11), e112963. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112963

Walter, M. C., Zwirglmaier, K., Vette, P., Holowachuk, S. A., Stoecker, K., Genzel, G. H., & Antwerpen, M. H. (2017). MinION as part of a biomedical rapidly deployable laboratory. Journal of Biotechnology, 250, 16–22. https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2016.12.006

Wang, Y., Zhao, Y., Bollas, A., Wang, Y., & Au, K. F. (2021). Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. Nature Biotechnology, 39(11), 1348–1365. https://doi.org/10.1038/s41587-021-01108-x

Watanabe, S., Tsubouchi, I., & Okubo, A. (2018). Efficacy and safety of fosravuconazole L-lysine ethanolate, a novel oral triazole antifungal agent, for the treatment of onychomycosis: A multicenter, double-blind, randomized phase III study. The Journal of Dermatology, 45(10), 1151–1159. https://doi.org/10.1111/1346-8138.14607

White, T. J., Bruns, T., Lee, S., & Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications (Vol. 1).

Wickham, H. (2007). Reshaping Data with the reshape Package. Journal of Statistical Software, 21(12). https://doi.org/10.18637/jss.v021.i12

Wickham, H. (2016). ggplot2 : Elegant Graphics for Data Analysis. Springer.

Wickham, H., Averick, M., Bryan, J., Chang, W., McGowan, L., François, R., Grolemund, G., Hayes, A., Henry, L., Hester, J., Kuhn, M., Pedersen, T., Miller, E., Bache, S., Müller, K., Ooms, J., Robinson, D., Seidel, D., Spinu, V., … Yutani, H. (2019). Welcome to the Tidyverse. Journal of Open Source Software, 4(43), 1686. https://doi.org/10.21105/joss.01686

Wickham, H., François, R., Henry, L., & Müller, K. (2021). dplyr: A Grammar of Data Manipulation.

Wilke, C. (2020). cowplot: Streamlined Plot Theme and Plot Annotations for "ggplot2."

Wood, D. E., & Salzberg, S. L. (2014). Kraken: ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments. Genome Biology, 15(3), R46. https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r46

Y

Yamada, T., Maeda, M., Alshahni, M. M., Tanaka, R., Yaguchi, T., Bontems, O., Salamin, K., Fratti, M., & Monod, M. (2017). Terbinafine Resistance of Trichophyton Clinical Isolates Caused by Specific Point Mutations in the Squalene Epoxidase Gene. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 61(7). https://doi.org/10.1128/AAC.00115-17

Z

Zhan, P., Liang, G., & Liu, W. (2021). Dermatophytes and Dermatophytic Infections Worldwide. In Dermatophytes and Dermatophytoses (pp. 15–40). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-67421-2_2

Zhang, X., Wang, Y., Chi, W., Shi, Y., Chen, S., Lin, D., & Jin, Y. (2013). Metalloprotease genes of Trichophyton mentagrophytes are important for pathogenicity. Medical Mycology, 1–10. https://doi.org/10.3109/13693786.2013.811552

Evaluation of high-throughput **genome sequencing** for **molecular typing** and **distinction** of **dermatophytes** of the *Trichophyton mentagrophytes / interdigitale / indotineae* complex

Dermatophytes are filamentous fungi with a tropism for keratinized tissue (nails, hair, and skin). It is the most common agent causing a mycosis. It is now estimated that 30% of the world's population is affected. The annual cost of treating them is more than 500 million USD, so it has become a public health problem. Therefore, it is essential to diagnose and treat these mycoses correctly, otherwise they may progress to chronic infection. However, identification remains difficult and slow at present. To overcome this, MALDI-TOF mass spectrometry has been considered but the results have highlighted a lack of sensitivity when applied to dermatophytes. Molecular biology was therefore presented as an alternative of choice. Currently, the identification of dermatophytes at the National Reference Center for Mycoses in Liège (NRCML) is based on a coupling of micro and macroscopic examination of the strains with sequencing of the internal transcribed spacer 2 segment, a universal barcode for cataloguing fungi. This approach, although very effective in its entirety, encounters some difficulties when it comes to distinguishing the species that form the *Trichophyton mentagrophytes / interdigitale* complex. Very close to each other, the distinction of these 2 species has not been considered as a priority as the treatment administered to the patient is often identical. Nevertheless, since 2018, there have been alarming reports from India of the emergence of strains resistant to terbinafine, the antifungal of choice for the treatment of dermatophytosis. After investigation, it has been established that these resistance phenomena originate from nonsense mutations in the gene that codes for squalene epoxidase. Moreover, these strains were considered as belonging to the species *Trichophyton mentagrophytes* until 2020. Further research revealed that they form in fact a distinct species. Named *Trichophyton indotineae*, this species is now part of the above-mentioned complex due to its genomic proximity to the 2 strains that form the latter. These cases of terbinafine resistant dermatophytes are not limited to the borders of India, since a first case has been detected in Belgium two years ago. However, the difficulties faced by the current method of identification of dermatophytes prevent an accurate estimation of the national frequency of these strains. Moreover, the frequency of terbinafine resistant strains within this species has been described in the literature as being higher than 50%. In view of this observation, it is essential to distinguish the species that form the *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* complex in order to best adapt the management of the patient. It is with this aim that the NRCML has launched this retrospective study. By deepening the knowledge related to this new species (and more globally, related to the complex of which it is a part), this center undertakes the launch of a national study planned between April 2022 and April 2023. This study aims on the one hand to establish the distribution of these strains in Belgium and on the other hand to characterize the squalene epoxidase mutations that circulate within the dermatophytes of the territory. To achieve this, the NRCML has turned to high-throughput genome sequencing.

Keywords

NGS × | Terbinafine × | *T. indotineae* ×

Dermatophytes × | Phylogenomics ×

T. mentagrophytes × | TEF1a × | ITS ×

El mouyaoui Khalid

Évaluation du **séquençage** à haut débit du **génome** pour le **typage moléculaire** et la **distinction** des **dermatophytes** du complexe *Trichophyton mentagrophytes / interdigitale / indotineae*

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux ayant un tropisme pour les tissus kératinisés (ongles, cheveux et peau). Il s'agit de l'agent le plus fréquent à l'origine d'une mycose. Il est aujourd'hui estimé que 30% de la population mondiale en est impactée. Le coût annuel lié à leur prise en charge se chiffre à plus de 500 millions USD, c'est donc devenu un problème de santé publique. Par conséquent, il est essentiel de diagnostiquer et de traiter correctement ces dermatophytoses, sous peine d'une évolution progressive en infection chronique. Cependant, l'identification reste difficile et lente à l'heure actuelle. Pour pallier cela, la spectrométrie de masse MALDI-TOF a été envisagée mais les résultats ont souligné un manque de sensibilité lors de l'application aux dermatophytes. La biologie moléculaire s'est donc présentée comme étant une alternative de choix. Actuellement, l'identification des dermatophytes au centre national de référence pour les mycoses de Liège (CNRML) est basée sur un couplage de l'examen micro et macroscopique des souches au séquençage du segment *internal transcribed spacer 2*, un code barre universel pour le catalogage des champignons. Cette approche, bien que très efficace dans sa globalité, se heurte à quelques difficultés lorsqu'il s'agit de distinguer les espèces qui forment le complexe *Trichophyton mentagrophytes / interdigitale*. Très proches l'une de l'autre, la distinction de ces 2 espèces n'a pas été désigné comme étant une priorité dans la mesure où le traitement administré au patient est souvent identique. Néanmoins, depuis 2018, des rapports alarmants en provenance de l'Inde font état de l'émergence de souches résistantes à la terbinafine, antifongique de choix pour le traitement des dermatophytoses. Après investigation, il a été établi que ces phénomènes de résistance ont pour origine des mutations non-sens au niveau du gène qui code la squalène époxydase. Par ailleurs, ces souches furent considérées comme appartenant à l'espèce *Trichophyton mentagrophytes* jusqu'en 2020. Des recherches appronfondies ont alors mis en évidence qu'il s'agissait en réalité d'une espèce distincte. Nommée *Trichophyton indotineae*, cette espèce fait aujourd'hui partie du complexe précédemment cité étant donné sa proximité génomique avec les 2 souches qui forment ce dernier. Ces cas de dermatophytes résistants à la terbinafine ne sont pas limités au frontières de l'Inde, puisqu'un premier cas fut détécté en Belgique il y'a de cela deux ans. Cependant, les difficultés auxquelles fait face la méthode l'identification actuelle des dermatophytes empêche d'établir une estimation précise de la fréquence nationale de ces souches. De plus, la fréquence des souches résistantes à la terbinafine au sein de cette espèce a été décrite dans la littérature comme étant supérieure à 50%. Face à ce constat, il devient essentiel de distinguer les espèces qui forment le complexe *T. mentagrophytes/interdigitale/indotineae* afin d'adapter au mieux la prise en charge du patient. C'est dans ce but que le CNRML a lancé cette étude rétrospective. En approfondissant les connaissances liées à cette nouvelle espèce (et de manière plus globale, liées au complexe dont elle fait partie), ce centre entreprend le lancement d'une étude nationale prévue entre avril 2022 et avril 2023. Cette étude vise d'une part à établir la distribution de ces souches en Belgique et d'autre part à caractériser les mutations de la squalène époxydase qui circulent au sein des dermatophytes du territoire. Pour y parvenir, le CNRML s'est tourné vers le séquençage à haut-débit du génome.

Mots-clés

NGS × Terbinafine × *T. indotineae* ×
Dermatophytes × Phylogénomique ×
T. mentagrophytes × TEF1a × ITS ×

El mouyaoui Khalid