



Arnaud Carlotti
Eurofins IDmyk
arnaud.carlotti@idmyk.com

Technologie/Process

Identification des moisissures

Introduction

Le terme «moisissure» est utilisé dans le langage courant pour désigner les champignons microscopiques. Ce sont des micro-organismes eucaryotes, dont les cellules s'allongent pour former des filaments d'environ 2 à 12 µm de diamètre, coenocytiques (non cloisonnés) ou septés (cloisonnés). L'enchevêtrement des filaments donne naissance à un mycélium visible à l'œil nu sur les milieux de culture (colonie fongique) ou les substrats colonisés. Les champignons sont généralement hétérotrophes, saprophytes, et capables de se propager dans différents environnements grâce à leurs aptitudes métaboliques étendues. Ils se reproduisent par voie sexuée et se multiplient végétativement en générant de nombreuses spores de dissémination. La classification des champignons repose sur les caractéristiques des filaments (champignons inférieurs et champignons supérieurs), des cultures, de reproduction sexuée, de multiplication végétative, physiologique et moléculaire. Les champignons filamenteux sont ubiquitaires, et retrouvés dans l'air, l'eau, les sols, sur les plantes vivantes ou en décomposition, dans les matières premières, etc... Ils peuvent être responsables de défauts dans les industries, notamment pharmaceutiques, par leur croissance, leur métabolisme ou leur pouvoir infectieux. Ils provoquent souvent des altérations d'aspect, de produits, ou d'environnement. Ils peuvent, selon les espèces et les souches voire l'environnement, générer des métabolites toxiques (mycotoxines), des composés organiques volatiles (COV) défavorables, des réactions allergiques et des infections superficielles ou profondes chez l'homme. Par exemple, l'espèce *Aspergillus fumigatus*, produisant des conidies de petite taille, est très invasive, chez des patients fortement immuno-déprimés elle provoque des aspergilloses pulmonaires invasives très souvent mortelles. D'autres espèces sont impliquées également dans des infections graves chez l'homme. Le nombre théorique

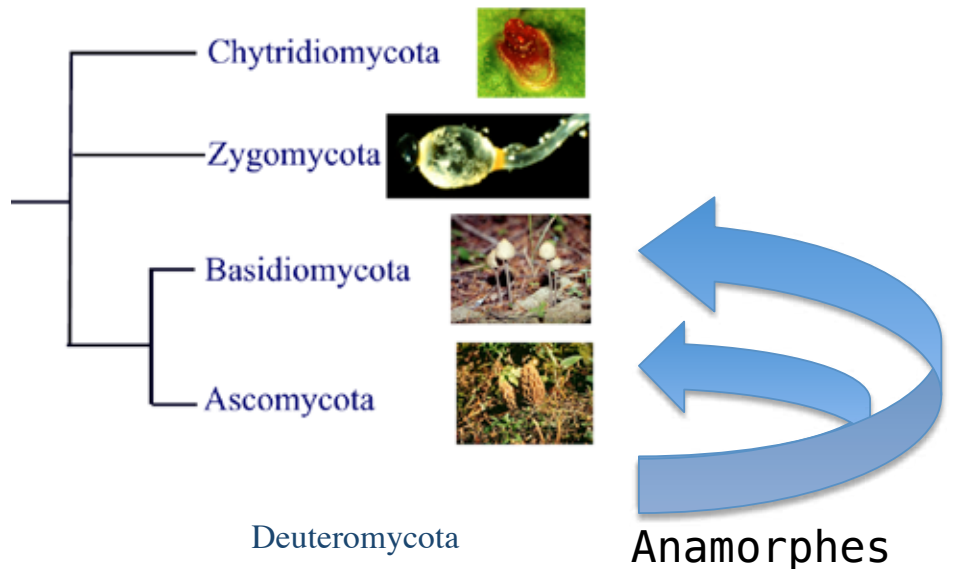


Figure 1 : Classification des champignons

des différentes espèces de champignons sur la terre a été estimé à 1 500 000 (Hawksworth et al., 1999), et environ 70 000 espèces seraient décrites, parmi lesquelles plusieurs milliers de «moisissures». Nous avons observé que les genres les plus fréquents dans les industries pharmaceutiques étaient *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium* etc... (figure 2).

La détection et l'identification des moisissures sont donc importantes au laboratoire de contrôle qualité. Nous pouvons distinguer d'une part les méthodes phénotypiques d'identification, dont la méthode «classique» basée sur les caractéristiques macroscopiques et microscopiques, et les méthodes basées sur les caractéristiques physiologiques ou protéomiques et d'autre part les méthodes moléculaires, basées sur les caractéristiques des séquences des acides nucléiques (ADN).

Méthodes phénotypiques

L'approche classique d'identification des champignons filamenteux est basée sur les critères de classification observables macroscopiquement et microscopiquement :

- 1) les caractéristiques des filaments (coenocytiques = champignons inférieurs; septés = champignons supérieurs),
- 2) les caractéristiques de reproduction sexuée (forme parfaite = téléomorphe), lorsqu'elle est connue, qui permettent par exemple de distinguer chez les champignons inférieurs les Zygomycètes (produisant des Zygosporangies) et chez les champignons supérieurs les Ascomycètes (formant des asques et des ascospores) ou les Basidiomycètes (formant des basides et des basidiospores). Lorsque le mode de reproduction sexuée est inconnu ou non visible (forme imparfaite : Anamorphe), les champignons supérieurs sont placés dans la

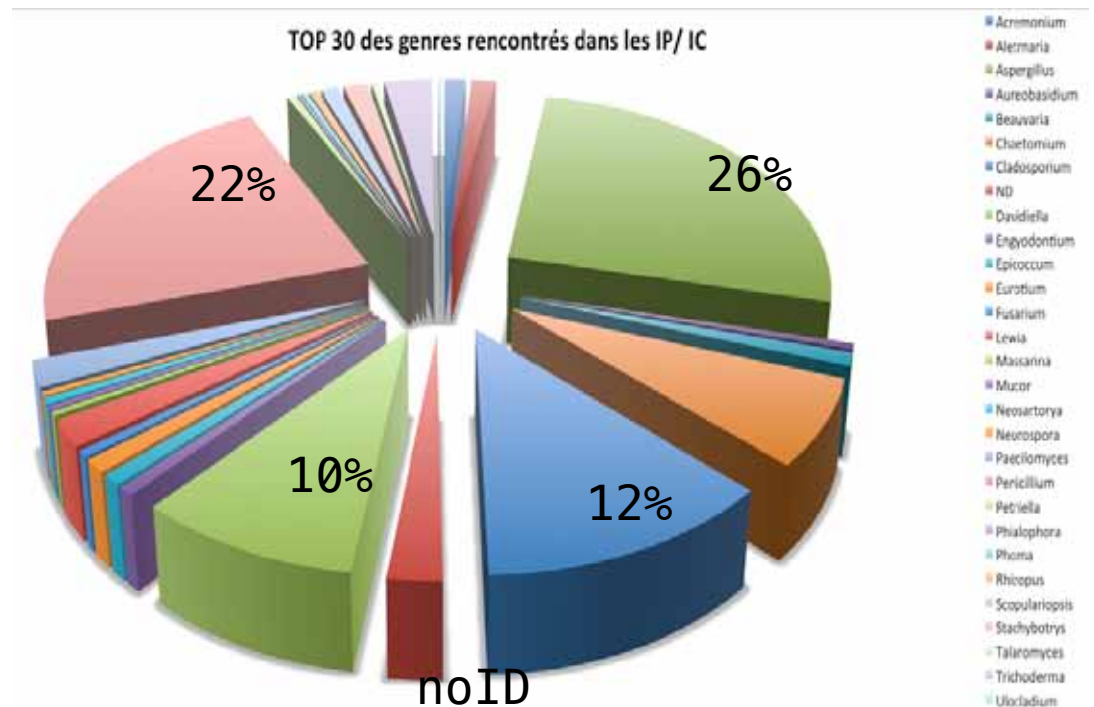


Figure 2 : Principaux genre de champignons rencontrés dans les industries pharmaceutiques (Communication personnelle A. Carlotti, étude basée sur plus de 1200 identifications moléculaires par séquençage comparatif unilocus/multilocus)

- classe des Deuteromycètes (synonymes Ade-
lomycètes, Fungi imperfecti), à laquelle sont
souvent assignées les moisissures (figure 1).
- 3) les caractéristiques de multiplication végéta-
tive, généralement spores endogènes chez
les champignons inférieurs (sporocystospores
dans des sporocystes portés par des sporocys-
tosphores), exogènes chez les champignons
supérieurs (conidies, conidiophores, ontogé-
nèse des conidies). Les Deuteromycètes sont
classés selon leurs modes de production des
spores de multiplication végétatives.
 - 4) les caractéristiques macroscopiques des
cultures (avers et envers) sur milieux usuels
(Malt Agar, PDA) ou spécifiques (e.g. Cza-
peck), après 3-7 jours de croissance voire
jusqu'à 28 jours.

Cette méthode classique d'identification pré-
sente un certain nombre d'avantages et d'incon-
vénients : un pré-requis est la formation spéciali-
sée des techniciens de laboratoire.

Au rang des avantages elle est simple et peu coû-
teuse en réactifs et matériels (boîtes de milieu de
culture, incubateur, ruban adhésif, lame, colorant,
microscope). Elle peut être rapide, il n'est pas
rare d'identifier directement à partir d'un prélève-
ment de surface contaminée, d'une boîte d'iso-
lement, etc... Certains critères font encore réfê-
rence pour la description des genres voire des
espèces (e.g. forme des conidiophores, aspects
et taille des conidies, etc...). La documentation
est aisée avec les systèmes de microscopes in-
corporant un appareil photographique et/ou une
caméra numériques.

Au rang des inconvénients nous pouvons citer
les nombreux cas de champignons ne formant
pas ou plus de structures de multiplication
végétative sur les milieux d'isolement, pour
lesquels sont observables uniquement les fila-
ments (>15% des cas selon notre expérience,
voire 100% pour certaines espèces). Il est alors
seulement possible d'orienter vers champignon
inférieur ou champignon supérieur. Néanmoins,
la documentation macroscopique des cultures
(forme, couleur (avers/envers), développement,
etc...) est un complément précieux et indis-
pensable pour établir d'éventuelles corrélations
dans le temps. Malheureusement les champi-
gnons sont polymorphes et polychromes selon
les conditions d'environnement, ce qui peut
compliquer la démarche.

Selon cette approche classique, pour un tech-
nicien bien formé et pratiquant régulièrement,
il est possible de distinguer environ 40 genres
différents parmi les plus fréquents (cf. figure 2)
et d'identifier exactement certaines espèces (e.g.
Aureobasidium pullulans) ou présomptivement
certaines autres (e.g. *Aspergillus fumigatus*, *Peni-
cillium glabrum*, *Cladosporium spp.*). Un diagnos-
tic exacte à l'espèce peut s'avérer impossible en
dépit d'investissements en temps conséquents.

Approches modernes phénotypiques basées sur
les caractéristiques physiologiques et/ou protéo-
miques

Au contraire des bactéries voire des levures, il
s'est avéré très difficile d'identifier les champi-
gnons filamenteux à partir de leurs seules apti-

tudes métaboliques (assimilation, fermentation
de substrats, sensibilité/résistance à certaines
molécules). Certains automates d'identification
ont tenté, avec plus ou moins d'insuccès selon
les genres et les espèces, de couvrir ce besoin,
mais nécessitent encore le recours aux observa-
tions macro- microscopiques pour affirmer/véri-
fier un diagnostic.

Une technique prometteuse est ré-apparue ces
dernières années, la spectrométrie de masse
(MALDI-TOF) qui permet d'établir des spectres de
masse dans une gamme définie à partir d'une
culture ou d'une suspension de spores et de
comparer à une base de donnée de spectres de
souches de référence de différentes espèces.

Les algorithmes de traitement des spectres ont
progressé de manière spectaculaire par rapport
aux années 1990-2000. Les résultats publiés ré-
cemment sont très intéressants, avec des perfor-
mances remarquables, mais soulignent la faible
représentativité des bases de données qui ne
couvrent que quelques dizaines à quelques cen-
taines d'espèces, parfois peu représentatives des
environnements des industries pharmaceutiques
et parfois pour un nombre de souche peu signifi-
catif. En effet, il est nécessaire d'utiliser un grand
nombre de spectres de souches différentes de la
même espèce afin de tenir compte de la variabi-
lité intra-espèce, pour obtenir un résultat d'iden-
tification fiable et robuste. La création, la mise au
point et la validation des bases de données est
donc un processus complexe, fastidieux et long.

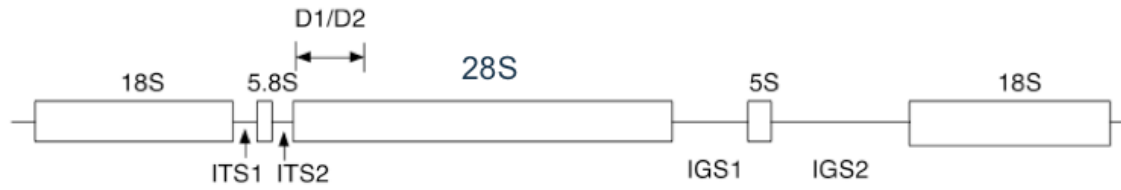


Figure 3 : Organisation des gènes codant les ARN ribosomiques et des régions intergéniques chez les champignons et présentant un intérêt pour l'identification moléculaire. (ITS : Séquence transcrite interne, IGR : séquence intergénique).

Méthode moléculaires

Depuis plus de 15 ans, les méthodes moléculaires ont pris une place prépondérante dans la taxonomie des espèces fongiques en général et des champignons filamenteux en particulier. La démonstration de l'intérêt des séquences des gènes codant les ARN ribosomiques (18S, 28S région variable V3 D1:D2) pour les études phylogénétiques a permis d'affiner la distinction des groupes taxonomiques et des espèces chez les champignons (Figure 3). Les régions intergéniques non transcrites de ces gènes (ITS1 et ITS2) se sont également avérées utiles pour la distinction des taxa (Figure 3). Ces deux types de marqueurs seuls ; ARNr28S ou ITS1/ITS2 (analyse unilocus), permettent une très bonne identification des genres, à partir des acides nucléiques extraits de n'importe quel mycélium, après amplification avec des amorces universelles chez les champignons inférieurs et supérieurs, et comparaison à des séquences de référence. Les bases de données de séquences de référence sont extrêmement riches, puisqu'à chaque description de nouvelle espèce les données de séquence des divers marqueurs sont générées. Néanmoins, toutes les séquences ARNr 28S ou ITS1/ITS2 ne sont pas connues simultanément pour toutes les espèces fongiques (environ 10-20 % sont manquantes pour chacun des deux types de marqueurs.). La région 28S D1:D2 fait référence pour la distinction de nombreuses espèces de champignons ascomycètes ou basidiomycètes. Les régions intergéniques ITS1-ITS2 combinées, ont été proposées comme «code barre de la vie» pour les espèces animales, les plantes et les champignons (Schoch et al., 2012 PNAS). Il n'y a pas de consensus sur un marqueur universel (unilocus). En effet, de nombreuses limitations ont été documentées pour l'identification des espèces fongiques, certaines espèces différentes pouvant présenter 100 % d'homologies avec l'un ou l'autre de ces marqueurs, voire les deux. Ainsi, dans des genres importants pour les

industries pharmaceutiques, comme *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria*, etc... la distinction précise des espèces courantes n'est pas possible avec les seules séquences ARNr 28S, ou ITS1/ITS2 seules ou combinées. La combinaison des deux régions ITS (ITS1/ITS2) s'est avérée plus performante que l'utilisation de l'une ou de l'autre séparées (ITS1 ou ITS2). Dans tous ces cas il s'avère nécessaire de recourir à d'autres marqueurs, pour différencier précisément les espèces au sein des genres (Schoch et al., 2012 PNAS). Ces autres marqueurs sont constitués par des gènes de ménage «House Keeping Genes» sur lesquels la pression de sélection est différente, et qui ont donc accumulé des mutations plus nombreuses pour des espèces ayant divergé plus récemment au cours de l'évolution. Les gènes de ménage retenus varient selon les groupes fongiques et les genres voire les espèces, nous pouvons citer les gènes codant pour le facteur d'élongation EF1a, l'actine, la calmoduline, la betatubuline, les différentes sous-unités des polymerases ARN, etc... Cette approche «multilocus», basée sur la comparaison simultanée de plusieurs séquences marqueurs permet de pallier aux limitations des approches unilocus. Ainsi la distinction fiable et précise des espèces est améliorée, dans de nombreux cas. Ces méthodes moléculaires d'identification par séquençage comparatif restent onéreuses, en raison des investissements lourds et des coûts réactifs (multilocus > unilocus). Elles sont par contre plus rapides que les méthodes classiques, s'appliquent à tous les champignons, même ceux ne sporulant pas. Elles nécessitent quand même une bonne connaissance de la mycologie et en particulier de la taxonomie fongique notamment pour gérer les noms des téléomorphe/anamorphe, deux noms différents pouvant correspondre à une même espèce. Enfin, avec le développement des méthodes moléculaires d'amplification en temps réel (PCR-RT), des tests spécifiques de détection-identifica-

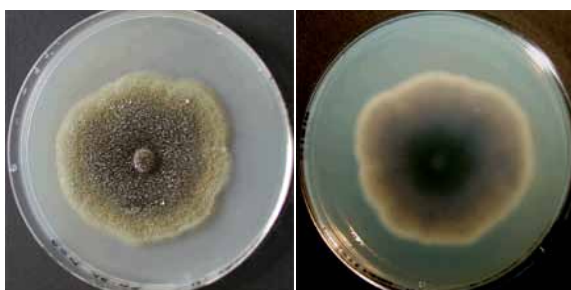
tion directs sont disponibles pour certaines espèces particulièrement importantes. Par exemple nous avons développé et validé un test de PCR en temps réel, multiplex, permettant de détecter et d'identifier précisément les souches d'*Aspergillus fumigatus*, à partir des matières premières, des prélèvements d'environnement, des produits finis en moins de 3 heures.

Conclusion

Nous avons différentes méthodes d'identification des moisissures à notre disposition qui permettent de répondre à l'objectif d'un contrôle efficace des environnements de production, des matières premières et des produits finis, pour une bonne maîtrise des productions. Les méthodes classiques, basées sur les observations macroscopiques et microscopiques, bien que délicates ou limitées, sont généralement pertinentes dans ce cadre, pour des techniciens bien formés. La spectrométrie de masse (MALDI-TOF) semble prometteuse pour une identification rapide et à haut débit des champignons. Les méthodes moléculaires permettent des identifications plus précises, plus fiables et plus exactes, les méthodes de séquençage comparatif multilocus s'avèrent plus performantes que les méthodes de séquençage comparatif unilocus (28S ou ITS) pour la discrimination des espèces. Enfin, toutes ces méthodes ne nous dispensent pas d'une bonne formation en mycologie afin de garder un œil critique sur les résultats générés et pour leur interprétation dans un contexte réglementaire de plus en plus exigeant. ■

Bibliographie :

Hawksworth et al., 1999
Schoch et al., 2012, PNAS



Observation d'une culture Avers/envers

Observation (gx400) de la multiplication végétative chez *Rhizopus* sp.

