

Thesis, COLLÉGIALITÉ

Auteur : Kurt, Bahoz

Promoteur(s) : Sacheli, Rosalie

Faculté : Faculté de Médecine

Diplôme : Master en sciences biomédicales, à finalité spécialisée en assurance qualité

Année académique : 2022-2023

URI/URL : <http://hdl.handle.net/2268.2/17933>

Avertissement à l'attention des usagers :

Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.

Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.



Étude nationale belge sur la prévalence de la résistance à la terbinafine au sein des espèces *Trichophyton interdigitale/mentagrophytes/indotineae*: caractérisation phénotypique et génotypique.

Réalisé par Bahoz **Kurt**
Master II **Sciences Biomédicales**
Année académique **2022-2023**
Sous la direction du Docteur Rosalie **Sacheli**
et la Professeure Marie-Pierre **Hayette**



LIÈGE université
Médecine

**Sciences biomédicales
et précliniques**

Remerciements

La tradition veut que nous exprimions notre gratitude envers ceux qui nous ont accompagnés tout au long de notre parcours, et écrire ces mots de remerciement est peut-être une des parties les plus difficiles.

Je souhaite exprimer mes sincères remerciements à la Chef de Service et Professeure Marie-Pierre Hayette. Sa disponibilité et son expertise ont grandement contribué à l'avancement de mon travail, et je lui suis profondément reconnaissant. Les conversations de fin de journée, où nous étions les derniers présents demeurent empreintes dans ma mémoire comme de précieux souvenirs. Votre dévotion et connaissances ont été des sources d'inspiration constantes, j'aspire sincèrement à être à la hauteur de vos attentes.

Je tiens ensuite à exprimer ma profonde gratitude au docteur Rosalie Sacheli, pour sa précieuse guidance et son soutien inestimable tout au long de mon stage. Son encadrement attentif, ses conseils éclairés et sa disponibilité m'ont permis de progresser de manière significative. Je suis sincèrement reconnaissant d'avoir pu bénéficier de cette opportunité de stage sous une supervision bienveillante, qui a grandement enrichi mon expérience. Même si ces quelques mots ne suffisent pas à exprimer toute ma reconnaissance, merci infiniment pour votre soutien indéfectible et cette influence positive tout au long de mon stage. J'espère sincèrement qu'à travers ce mémoire, vous ne regretterez pas le temps précieux que vous m'avez accordé.

Je remercie également l'ensemble du service de microbiologie pour leur accueil chaleureux (Steph, Véro, Françoise, Fabrice, Bernadette, Sam et les autres) et particulièrement l'équipe du CNR (Caro, Rajae, Sabrina et Quentin). Leur hospitalité et bienveillance ont contribué à rendre mon expérience au sein du service des plus agréables. Sabrina, si le mot gentillesse n'avait pas de nom il porterait le tien. Ta présence constante, (quasiment) à toute heure, ton enseignement ainsi que ta guidance ont été des éléments clés de ma réussite. En plus de ton aide précieuse, tu m'as rendu plus patient, me faisant réaliser que le chemin le plus court n'était pas toujours le meilleur. Rajae, toutes ces discussions sur divers sujets, les astuces partagées et l'aide précieuse apportée ont contribué à l'achèvement de ce projet. Ton absence se faisait véritablement ressentir, tant j'appréciais ta compagnie.

Khalid, comment pourrais-je t'oublier ? Malgré un planning constamment chargé, tu as consacré bien plus que ton temps précieux pour m'aider, m'expliquer et me prodiguer des astuces. Ces quelques mots ne seront jamais suffisants pour exprimer toute ma gratitude, mais sache que c'est en partie grâce à toi que j'ai trouvé la motivation nécessaire pour persévérer.

Je tiens à remercier ma maman, mes frères et Selin pour votre soutien inconditionnel, vos conseils avisés et votre présence réconfortante qui ont été des piliers essentiels de ma réussite. Votre confiance et amour inébranlable m'ont donné la force et la motivation nécessaires pour surmonter les obstacles et atteindre mes objectifs. Je suis infiniment reconnaissant de pouvoir compter sur vous dans chaque étape de ma vie. Finalement, je tenais à remercier Alen, Nawal, Jessica, Oussama, Widad et Sammy, nous avons débuté ce parcours ensemble et toutes ces années universitaires passées ensemble ont créé des souvenirs précieux qui resteront gravés dans ma mémoire, vous avez rendu mon expérience académique enrichissante et mémorable. Marie, non je ne t'ai pas oublié, toi qui fut ma partenaire pour bien des travaux, les moments passés à travailler à tes côtés étaient empreints de créativité, d'entraide et d'une énergie positive. Merci pour ta contribution et ton dévouement tout au long de notre parcours.

Liste des abbréviations

5-FC : 5-fluorocytosine
60S : Sous-unité ribosomique 60S
A. fumigatus : *Aspergillus fumigatus*
A. niger : *Aspergillus niger*
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNr : ADN Ribosomique
AmB : Amphotéricine B
BD : Base de données
C. albicans : *Candida albicans*
CNR : Centre National de Référence
DMSO : diméthylsulfoxyde
ECOFF : Epidemiological Cut-Off Value
ED : Examen Direct
Ef1-alpha : facteur d'élongation 1-alpha,
FdUMP : fluorodésoxyuridine monophosphate
FUTP : triphosphate de fluorouridine
HMG : groupe à haute mobilité
ITS : : Internal Transcribed Spacer
LSU : Large Subunit Unit / grande sous-unité ribosomale
McF : MacFarland (unité)
MLT : pour Maximum Likelihood Tree
Oligos : oligonucléotides
Pb : paire de bases
PCR : réaction en chaîne par polymérase
RPMI : Roswell Park Memorial Institute
SCAA : Sabouraud-chloramphénicol Agar supplémentée d'actidione
SF : séquence forward
SGC2 : milieu Sabouraud gentamicine chloramphénicol agar
SQ : score de qualité
SR : séquence reverse
T. mentagrophytes : *Trychophyton mentagrophytes*
T. rubrum : *Trychophyton rubrum*
Trb : terbinafine
VQ : score de qualité
WD : wild type
WGST : WGS Typer

Table des Matières

Table des matières

		1-1
1	Introduction	1-1
1.1	Généralités sur les champignons	1-2
1.2	<i>Types d'infections fongiques</i>	1-2
1.3	<i>Cytologie et morphologies des champignons</i>	1-2
1.4	<i>Généralités sur les dermatophytes</i>	1-4
1.5	<i>Mode de transmission</i>	1-4
1.6	<i>Taxonomie</i>	1-5
1.7	<i>Épidémiologie des dermatophytes</i>	1-7
1.8	<i>Mécanismes d'adhérence cutanée et d'invasion des dermatophytes</i>	1-9
1.9	<i>Manifestations cliniques</i>	1-10
1.9.1	Onychomycose (tinea unguium)	1-10
1.9.2	Teigne de la peau glabre et pieds (tinea corporis & pedis)	1-12
1.9.3	Teigne du cuir chevelu (tinea capitis)	1-12
1.10	<i>Identification des dermatophytes</i>	1-14
1.10.1	Biopsie et anamnèse des prélèvements	1-16
1.10.2	Examen direct des échantillons	1-16
1.10.3	Culture et examen macroscopique des échantillons	1-18
1.10.4	Examen microscopique des cultures de dermatophytes	1-18
1.10.5	Spectrométrie de masse MALDI-TOF	1-20
1.10.6	Réaction en chaîne par polymérase (PCR)	1-22
1.10.7	Séquençage Sanger	1-26
1.10.8	Séquençage de nouvelle génération (NGS)	1-28
1.11	<i>Traitement des dermatophytoses</i>	1-30
1.11.1	Classe des allylamines	1-30
1.11.2	Classe des azolés	1-32
1.11.3	Amorolfine (classe des morpholines)	1-32
1.12	<i>Résistances aux antifongiques</i>	1-34
1.12.1	Mécanisme de résistance à la terbinafine	1-34
2	Objectifs et stratégies expérimentales	2-1
2.1	<i>Contexte de l'étude</i>	2-1
2.2	<i>Objectif de l'étude</i>	2-1
2.3	<i>Stratégie expérimentale</i>	2-2
2.3.1	Approche pratique	2-2
2.3.2	Approche bio-informatique	2-2
3	Matériel et méthodes	3-1
3.1	<i>Caractéristiques des souches</i>	3-1

3.2	<i>Réception, encodage et stockage des échantillons</i>	3-1
3.3	<i>Screening du profil de résistance à la terbinafine</i>	3-2
3.4	<i>Screening sur plaque 12 puits (dermacheck)</i>	3-3
3.5	<i>Méthode de confirmation par microdilution EUCAST E.Def. 11.0</i>	3-5
3.6	<i>Séquençage Sanger Ef1-alpha</i>	3-8
3.7	<i>Séquençage haut débit NGS Illumina</i>	3-9
3.8	<i>Traitement des données de séquençage</i>	3-10
3.8.1	Données de séquençage Sanger	3-10
3.8.2	Données de séquençage Illumina NovaSeq6000	3-11
3.9	<i>Stratégie d'assemblage</i>	3-11
3.10	<i>Analyse des marqueurs moléculaires</i>	3-12
3.11	<i>Identification des souches traitées</i>	3-13
3.11.1	Approche phylogénomique	3-13
3.11.2	Approche phylogénétique	3-13
4	Résultats	4-1
4.1	<i>Résultats dermacheck (plaque 12 puits)</i>	4-1
4.2	<i>Antifongogramme EUCAST E.DEF.11.0</i>	4-1
4.3	<i>Caractérisation par séquençage haut débit</i>	4-2
4.3.1	Analyse des marqueurs moléculaires	4-2
4.3.2	Analyse du dendrogramme	4-2
4.3.3	Arbre phylogénétique ITS (NGS)	4-5
4.3.4	Arbre phylogénétique Ef1-alpha	4-5
4.4	<i>Caractérisation par séquençage Sanger</i>	4-6
4.4.1	Arbre phylogénétique Ef1-alpha	4-6
5	Discussion	5-1
5.1	<i>Taux de résistance à la terbinafine au cours de l'étude et discussion des méthodes employées</i>	5-1
5.1.1	Méthodes de screening (Dermacheck).	5-1
5.1.2	Méthode de confirmation (EUCAST E.DEF 11.0).	5-2
5.1.3	Fréquence des souches <i>T. indotineae</i> résistantes à la terbinafine.	5-3
5.2	<i>Analyses bioinformatiques</i>	5-4
5.3	<i>Whole Genome Sequencing (WGS)</i>	5-4
5.4	<i>Arbre phylogénétique ITS</i>	5-5
5.5	<i>Arbre phylogénétique Ef1- α</i>	5-6
5.6	<i>Identification des espèces</i>	5-6
6	Conclusions & perspectives	6-1
6.1	<i>Conclusions</i>	6-1
6.1	<i>Perspectives</i>	6-1
7	Bibliographie	7-1
8	Annexes	8-7



INTRODUCTION

1. INTRODUCTION

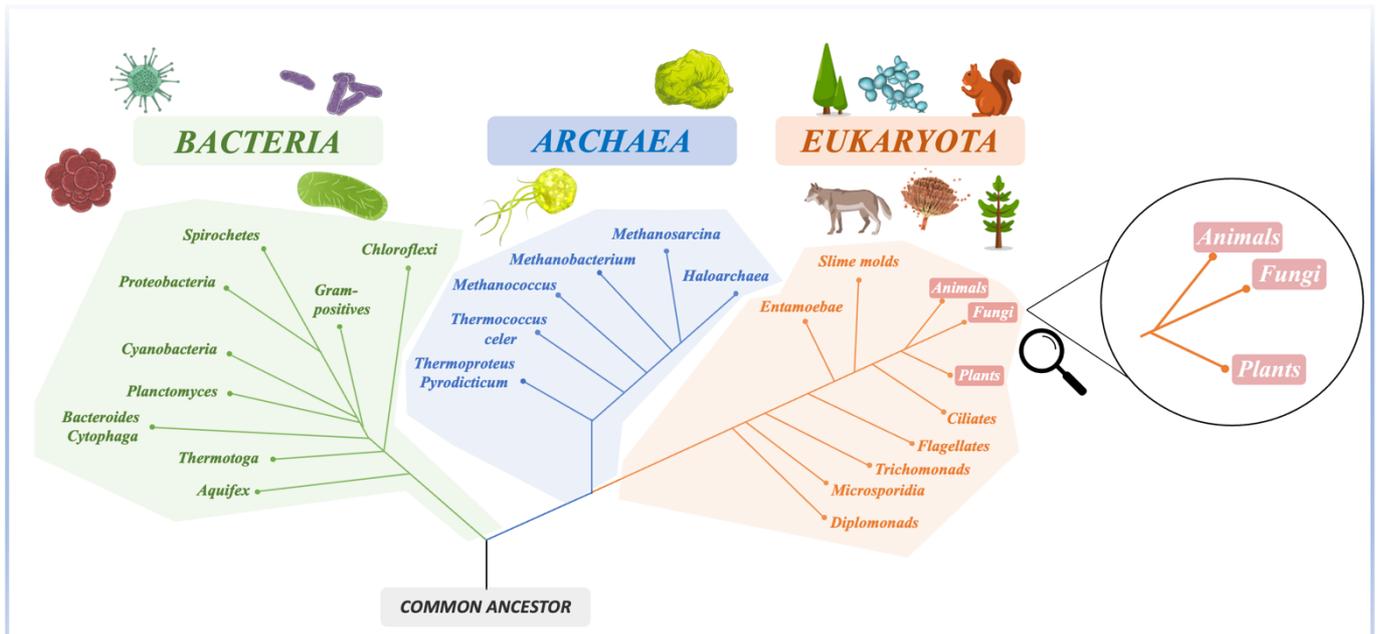


Figure 1 : Arbre phylogénétique.

Représentation des relations de parenté entre les différents groupes d'êtres vivants à partir des séquences d'ARN. Au sein des eucaryotes, le règne animal et celui des mycètes sont fort proches, ce qui se traduit par des similitudes entre les deux règnes.

Source : figure personnelle, inspiré de Forterre, 2015 ; Woese *et al.*, 1990

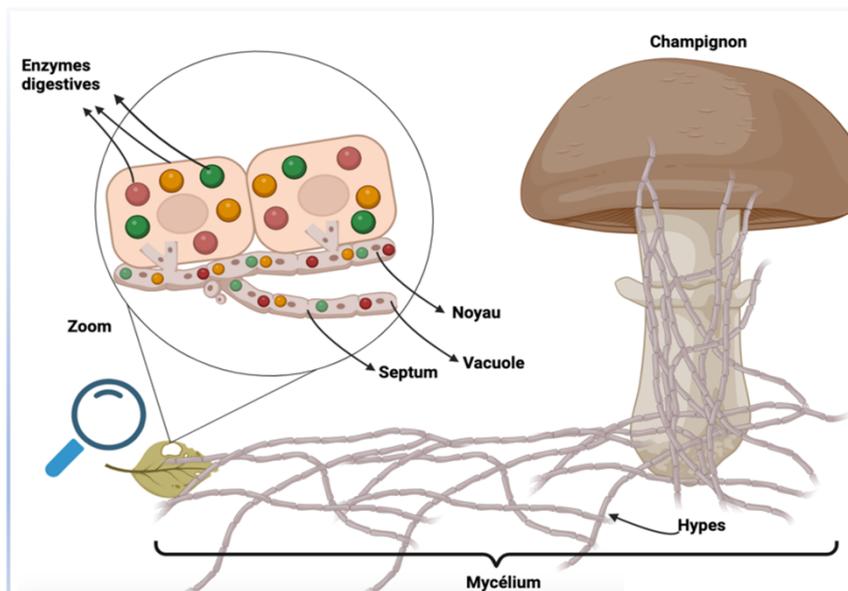


Figure 2 : Mode de digestion hétérotrophique chez un Basidiomycète.

Illustration de la digestion hétérotrophique d'un basidiomycète, par le rejet d'enzymes digestives dans son environnement et l'absorption de la matière organique via un réseau de hyphes (mycélium).

Source : figure personnelle, inspiré de Antinori *et al.*, 2021

1.1 Généralités sur les champignons

Les champignons sont des organismes eucaryotes hétérotrophes, appartenant au règne des fungi (ou mycètes). Bien que la mycologie ait été classée initialement comme faisant partie de la botanique, des études ont démontré que le règne des fungi est plus étroitement lié à celui des animaux, sur la base d'analyses de séquences d'acides aminés portant sur plusieurs enzymes (1 ; cf figure 1). Il existe une grande diversité au sein du règne des champignons, comprenant notamment des organismes macroscopiques (macromycètes), microscopiques (micromycètes), des levures (unicellulaires microscopiques) et des moisissures (pluricellulaires microscopiques). Les champignons se trouvent sur presque tous les types d'environnement, terrestres ou aquatiques, et peuvent parasiter les plantes, les animaux, les sols, les eaux, etc. Ils possèdent diverses caractéristiques, notamment le fait d'être hétérotrophes au carbone, c'est-à-dire qu'ils dépendent d'autres êtres vivants comme source de nutriments (contrairement aux plantes). En effet, ils digèrent les aliments de l'extérieur, en relarguant différentes enzymes digestives dans leur environnement (protéolytiques, glycolytiques ou lipolytiques) pour ensuite absorber les nutriments via leurs racines ou hyphes (cf figure 2).

1.2 Types d'infections fongiques

De manière générale, il est admis que les champignons sont principalement inoffensifs pour l'homme, à l'exception d'une centaine d'espèces qui peut causer des infections fongiques, communément appelées mycoses (2). Ces mycoses sont classifiées selon le site d'infection, la voie d'acquisition et la virulence des agents pathogènes (3). De ce fait, différents types de mycoses existent :

- Les **mycoses superficielles**, qui affectent la couche cornée de la peau et les ongles (la couche la plus externe), sont les plus répandues, touchant entre 20 et 25% de la population mondiale. Elles sont majoritairement causées par des dermatophytes, et en particulier par le *Trichophyton rubrum* (*T. rubrum*), suivi de la série *Trichophyton mentagrophytes* (4).
- Les **mycoses sous-cutanées et invasives** : sont souvent liées à des champignons opportunistes chez des personnes immunodéprimées (*C. albicans*, *A. fumigatus*), , communément des micromycètes saprophytes, se nourrissant de matière organique morte, souvent en décomposition. L'infection survient après un traumatisme local (coupure, plaie, etc.) et évolue lentement et chroniquement, ce qui compromet le succès thérapeutique (5).

1.3 Cytologie et morphologies des champignons

Les parois cellulaires fongiques constituent des structures dynamiques et décisives pour les interactions entre les cellules fongiques et leur environnement, grâce à des récepteurs et adhésines, entre autres. Leur composition varie d'une espèce à l'autre, mais est cruciale pour maintenir l'homéostasie cellulaire ainsi que pour la morphogenèse et la pathogenèse des mycètes (6).

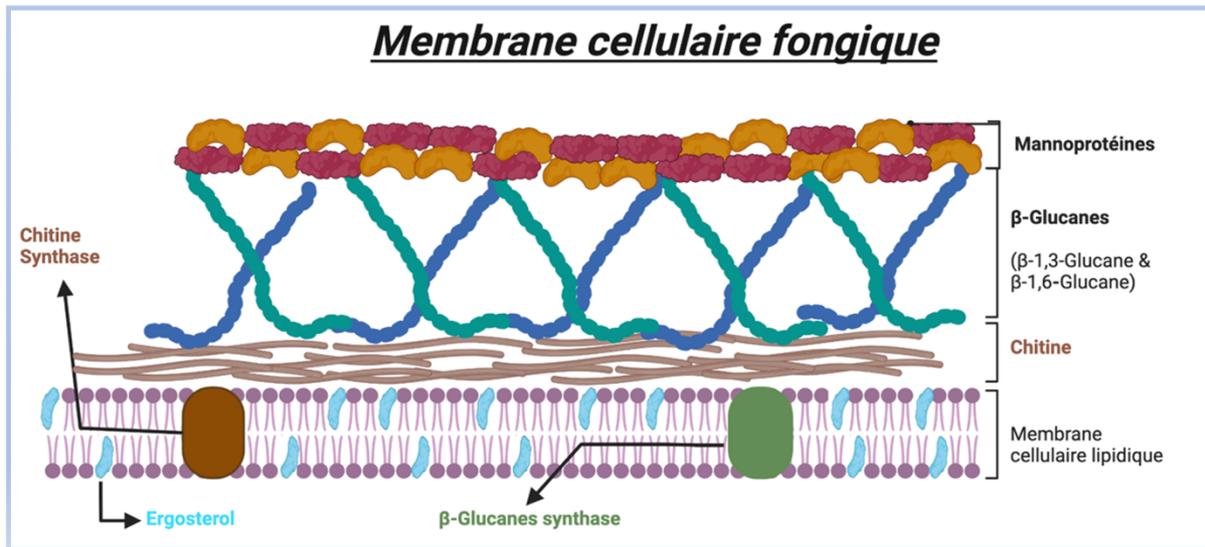


Figure 3 : Schéma de la membrane et paroi cellulaire fongique.

La membrane cellulaire fongique est constituée de divers éléments, notamment de l'ergostérol au niveau de la bicouche lipidique qui assure la perméabilité et la fluidité membranaire et qui est notamment ciblée par divers traitements contre les mycoses.

Source : figure personnelle, inspiré de : [Antinori et al., 2021](#) ; [Garcia et al., 2020](#)



Figure 4 : Dermatophytose induite sur un caracal causée par *T. mentagrophytes*

Dermatophytose localisée au niveau de la tête du caracal. Diverses lésions sont observables (A), notamment une alopecie au niveau de la région infectée, un érythème, une érosion ou encore la formation de croûtes. Une dermatophytose est également observable au niveau du membre inférieur gauche (B).

Référence : [A.Hasiri et al., 2015](#)

Les parois cellulaires des champignons sont constituées de glucanes, de polysaccharides (tels que la chitine et ses dérivés comme la chitosane), de lipides et de glycoprotéines (figure 3).

- En ce qui concerne les polysaccharides, les β -glucanes sont les plus abondants dans les parois cellulaires fongiques (on trouve également des α et β -glucanes). Ils sont synthétisés par des glucanes synthases et contribuent à la résistance, l'élasticité de la paroi cellulaire, sa croissance et sa virulence. Avec la chitine, ils constituent les composants les plus importants des parois cellulaires fongiques (7).
- La bicouche lipidique contient également de l'ergostérol, un stérol spécifiques des champignons, et d'une grande importance, car c'est une cible pour les antifongiques. L'ergostérol est essentiel à la fluidité et à la perméabilité membranaire fongique, assurant ainsi l'intégrité membranaire (8). En somme, la paroi cellulaire fongique est une structure dynamique et diversifiée qui permet aux cellules de s'adapter et de réagir face aux stimuli environnementaux, en interagissant avec l'environnement extérieur.

1.4 Généralités sur les dermatophytes

Les dermatophytes sont des champignons filamenteux kératinophiles et sont responsables de la majorité des mycoses superficielles de la peau, appelées dermatophytoses. Ces derniers peuvent affecter l'épiderme, les phanères (cheveux, ongles ou poils) et, dans de rares cas, les muqueuses, les viscères (maladie dermatophytique) ou encore les tissus sous-cutanés. Ces infections peuvent avoir lieu chez les humains et les animaux (9 ; cf figure 4). Ces champignons ont la capacité de se nourrir de kératine, que ce soit d'origine humaine ou animale, grâce à la sécrétion d'enzymes telles que les kératinases, qui ont la capacité de dégrader la kératine. Lorsque l'agent causal d'une mycose est un dermatophyte, celle-ci est qualifiée de dermatophytose ou teigne (10). La distribution des dermatophytes varie en fonction de divers paramètres, tels que la zone géographique, le sexe, l'âge, la migration, la zone corporelle et le contexte socio-économique. Les mycoses sont largement répandues à travers le monde et représentent un enjeu économique important (11,5 milliards de dollars aux États-Unis en 2019) ainsi qu'un intérêt majeur pour la santé publique et vétérinaire (11).

1.5 Mode de transmission

Les dermatophytes sont classés en trois groupes selon leur habitat naturel (12).

- **Les dermatophytes telluriques** (ou géophiles), ont une préférence pour les sols souillés et sont saprophytes (ex : *Nanizzia gypsea*). Ils ont une faible propension à infecter les humains et les animaux et l'infection chez l'Homme se produit généralement suite à un traumatisme ou une exposition à la souillure tellurique lors de pratiques agricoles par exemple (13).

- **Les dermatophytes zoophiles**, ont une préférence pour les tissus animaux tels que les poils et les plumes. La transmission à l'homme se fait soit par un contact direct avec l'animal contaminé, soit de façon indirecte par l'intermédiaire des poils contaminés de l'animal. Les dermatophytoses causées par les espèces zoophiles sont généralement fort inflammatoires. Les infections transmises par les dermatophytes zoophiles, telles que *Trichophyton mentagrophytes*, se réalise principalement par l'intermédiaire des rongeurs et des lapins, celle de *Microsporum canis* par l'intermédiaire de chats ou chiens (14).

- **Les dermatophytes anthropophiles** infectent exclusivement l'homme et ont une répartition cosmopolite. La transmission de ces dermatophytes est interhumaine, soit par des contacts directs (cheveux ou poils contaminés), soit indirectement par l'intermédiaire de supports contaminés comme les vêtements, peignes ou encore les serviettes. Les infections induites par les dermatophytes anthropophiles, telles que *T. interdigitale* sont généralement chroniques, bénignes et non inflammatoires mais peuvent tout de même atteindre des proportions épidémiques (15).

1.6 Taxonomie

Des améliorations significatives dans l'étude de la morphologie des dermatophytes ont été apportées au XXème siècle grâce à l'invention du microscope électronique qui a permis l'observation de structures microscopiques. En 1910, le chercheur Raymond Sabouraud a réalisé la première étude systématique des dermatophytes en associant l'aspect clinique des lésions aux caractéristiques macro- et microscopiques des dermatophytes ainsi qu'au mode de parasitisme pileaire. Cette approche a permis de classer les dermatophytes en quatre genres, à savoir *Achorion*, *Epidermophyton*, *Microsporum* et *Trichophyton* (16)

Au fil des décennies suivantes, la communauté scientifique a proposé une multitude de noms d'espèces, principalement en prenant en compte la morphologie des champignons, mais également par la découverte de nouvelles espèces et en ajoutant des critères de discrimination tels que la phase sexuée (forme télomorphe), les réactions immunitaires induites, les besoins nutritionnels ou encore la sensibilité aux antifongiques (17).

Actuellement selon la récente reclassification moléculaire basée sur les séquences géniques de la bêta tubuline, ITS, LSU, Efl-alpha et 60S, le règne fongique est constitué de neuf clades à savoir, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Nannizzia*, *Microsporum*, *Lophophyton*, *Arthroderma*, *Paraphyton*, *Guarromyces* et *Ctenomyces* (18). Les récentes révisions ont permis de reclassifier certaines espèces, notamment au sein du complexe *T. mentagrophytes*, qui comprenait notamment *T. interdigitale*, *T. mentagrophytes* et *T. benhamiae* (anciennement *Arthroderma benhamiae*). Sur base des caractères génotypiques, *T. benhamiae* ne fait plus partie du complexe *mentagrophytes* et a été décrit comme faisant partie de la série distincte *T. benhamiae*.

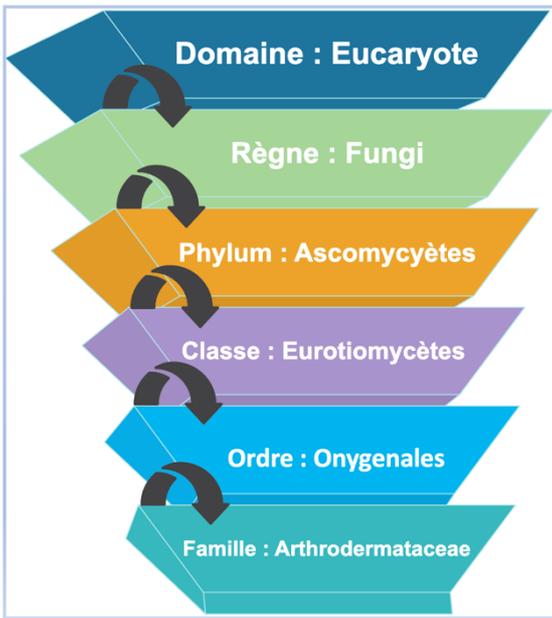


Figure 5 : Rangs taxonomiques des dermatophytes.

Référence : figure personnelle

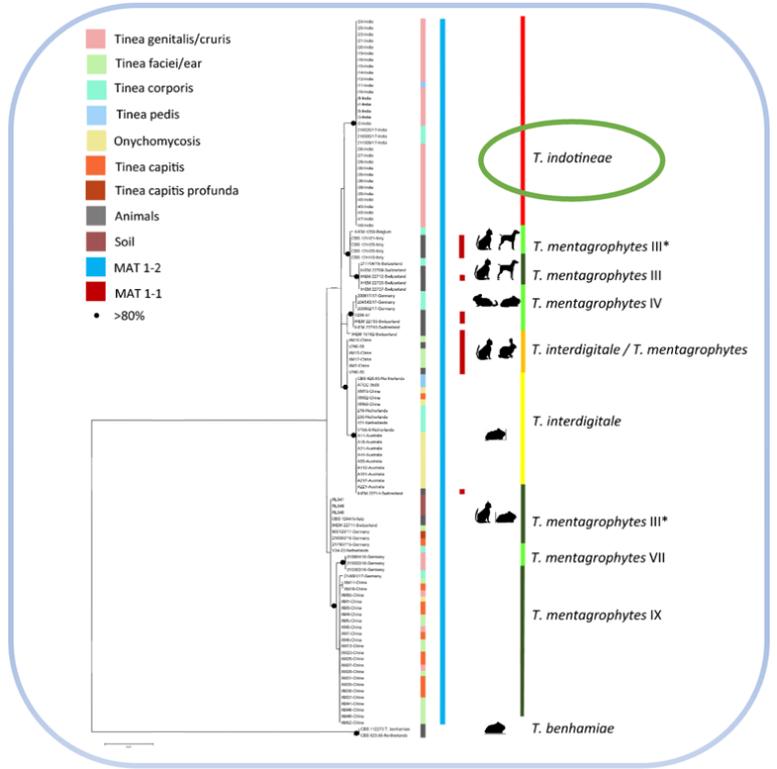


Figure 6 : taxonomie des dermatophytes du genre *Trichophyton*

Une distinction est faite entre les espèces *T. mentagrophytes*, *T. indotineae* et *T. interdigitale*, tous appartenant au genre *Trichophyton*.

Référence : [Tang et al., 2021](#)

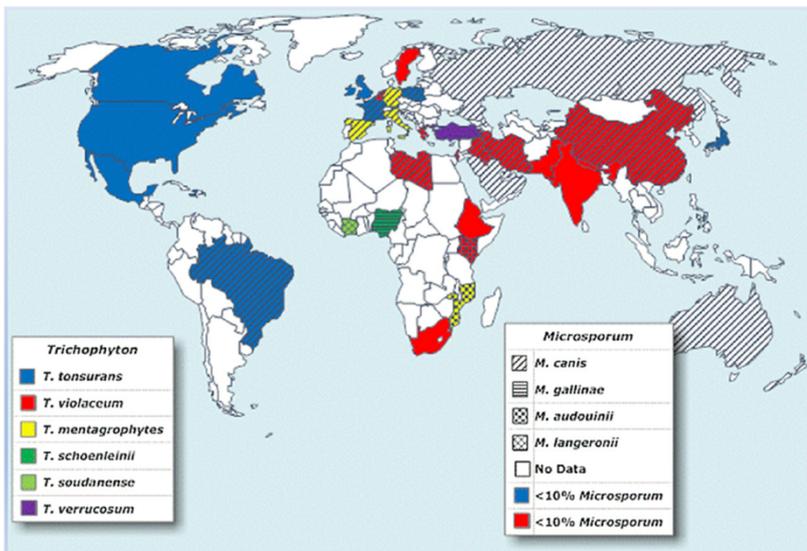


Figure 7: Distribution mondiale des dermatophytes

Comme les dermatophytes sont capables de s'adapter à tous types d'environnements, il n'est pas surprenant de les trouver partout dans le monde.

Références : [Kelly, 2012](#)

Les dermatophytes appartiennent au règne des Fungi, au phylum *Ascomycota*, à la classe des *Eurotiomycètes*, à l'ordre des *Onygenales* et à la famille des *Arthrodermataceae* (cf figure 5). **Au long de ce mémoire, le terme “série *T. mentagrophytes*” regroupera uniquement les espèces *T. mentagrophytes sensu stricto*, *T. indotineae* et *T. interdigitale*.**

En ce qui concerne *T. indotineae*, son identité fut sujet à de nombreux débats. En sachant que les génotypes de *T. interdigitale* correspondent à des génotypes anthropophiles et causent principalement des onychomycoses alors que les génotypes *T. mentagrophytes* sont zoophiles, et sont responsables de lésions inflammatoires chez l'homme, *T. indotineae* présente un mode de transmission anthropophile (suggérant être proche de *T. interdigitale* anthropophile) mais induit de l'inflammation (suggérant être proche de *T. mentagrophytes* zoophile). C'est pourquoi, une étude taxonomique fut menée par Tang *et al* en 2021, combinant des caractéristiques moléculaires, morphologiques et physiologique. Cette étude a conclu que l'agent étiologique (initialement nommé *T. mentagrophytes* ITS type VIII) était une espèce distincte du groupe *T. interdigitale/mentagrophytes*, appelée ***T. indotineae***, distinguée sur base d'une séquence "groupe à haute mobilité" (HMG) comme suggéré par Kano *et al.* en 2020 (19 ; 20 ; 21 ; cf figure 6).

1.7 Épidémiologie des dermatophytes

La distribution des dermatophytes est largement répandue à travers le monde, avec une prévalence mondiale estimée à 20-25 % (22 ; cf figure 7). De plus, certains dermatophytes sont cosmopolites, tels que *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *M. canis*, *N. gypsea* et *E. floccosum*, tandis que d'autres sont plus restreints géographiquement, comme *T. schoenleinii* (Afrique et Eurasie), *T. soudanense* (Afrique), *T. violaceum* (Afrique, Asie, Europe) ou encore *T. concentricum* restreint en Extrême-Orient, Inde et îles du Pacifique (23). Il convient de souligner que la distribution géographique des dermatophytes peut évoluer dans le temps, sous l'influence de facteurs tels que les changements climatiques, l'urbanisation ou les déplacements de population.

Par conséquent, il est essentiel de surveiller l'épidémiologie mondiale des dermatophytes afin de mieux comprendre leur répartition géographique et d'adapter les stratégies de prévention et de traitement en conséquence (23 ; 24). Par exemple, avant la seconde guerre mondiale, en Europe, *M. audouinii* et *E. floccosum* étaient les agents étiologiques majoritaires. Cependant, depuis les années 50, les cas de *tinea pedis* sont de plus en plus fréquents, classant *T. rubrum* comme l'agent étiologique le plus fréquemment retrouvé, suivi de *T. mentagrophytes*, tant en Europe centrale qu'en Europe du Nord. Alors qu'en Europe du sud et les pays arabes, des dermatophytes zoophiles sont principalement retrouvés tels que *M. canis* et *T. verrucosum* (25). Plus récemment, une situation alarmante est observée en Inde depuis 2018 (particulièrement dans le nord de l'Inde) de dermatophytoses, en particulier des *tinea cruris* et *corporis* étendus, chroniques ou récalcitrantes, résistantes à la terbinafine dans des isolats initialement identifiés comme *T. interdigitale* mais corrigée après une étude taxonomique comme *T. indotineae* (19).

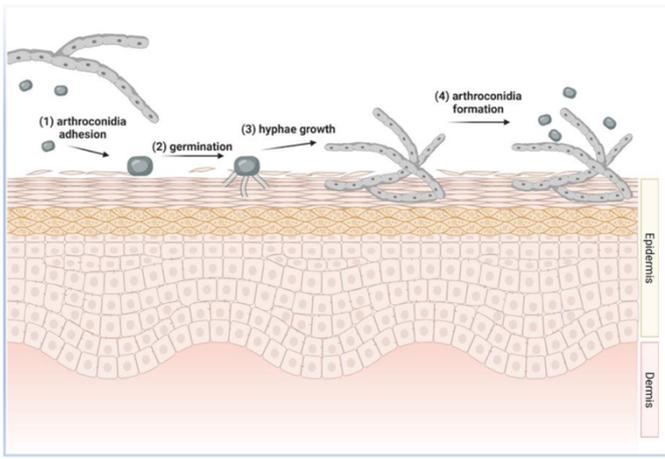


Figure 9 : Étapes d'initiation d'une infection fongique cutanée.

(1) Une fois les arthroconidies fixés au derme (entre 2 et 6h après contact), ceux-ci initient l'étape de germination (2)formant des tubes germinatifs. Les hyphes fongiques vont croître jusqu'à pénétrer dans les couches plus profondes de l'épiderme (3). Dans les 7 jours suivant l'infection, des arthroconidies se forment et le cycle se répète (4).

Référence : Moskaluk, VandeWoude, 2022

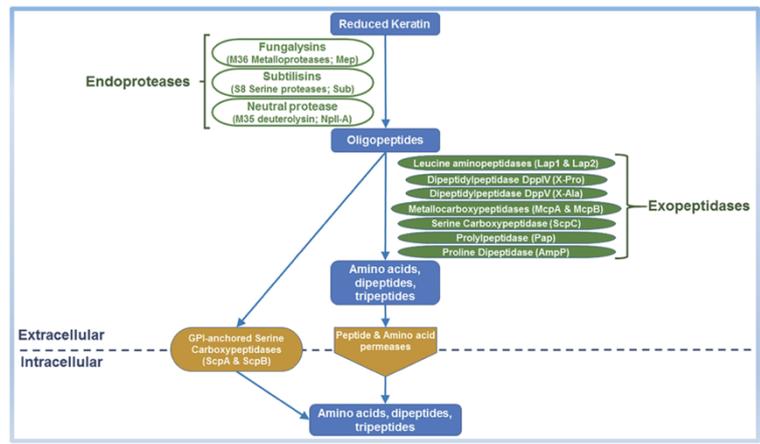


Figure 11 : différents groupes de protéases produites par les dermatophytes

Représentation des différents groupes de protéases produites par les dermatophytes afin d'initier la dégradation de la kératine, avec comme principaux groupes les protéases de la famille des subtilisines et fungalysines.

Référence : Derry et al., 2019

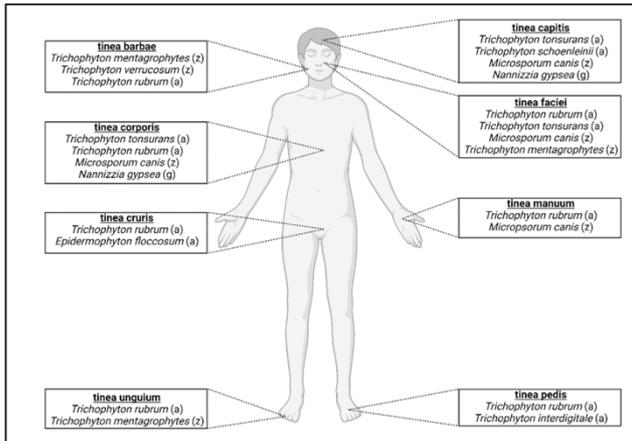


Figure 10 : Classification de la dermatophytose chez l'homme.

La localisation anatomique de l'infection détermine le type de dermatophytose. Pour chaque classification, les espèces fongiques les plus répandues qui causent l'infection sont répertoriées ; (a) = anthropophile ; (z) = zoophile ; (g) = géophile.

Référence : Moskaluk, VandeWoude, 2022

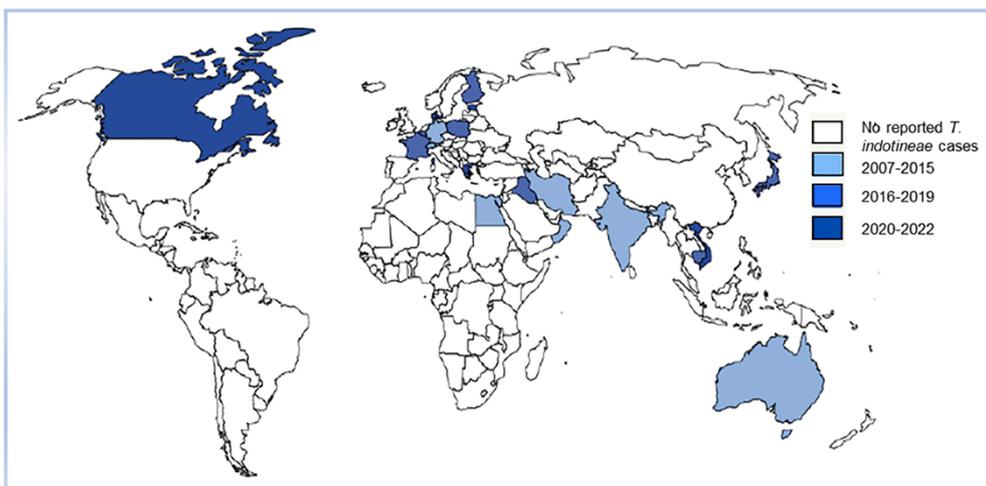


Figure 8 : répartition mondiale des cas de teignes confirmées de *T. indotineae*, de 2007 à 2022.

Référence : Jabet et al., 2023

La cause de cette épidémie s'avère être multifactorielle, comprenant des facteurs environnementaux et comportementaux. La prévalence accrue d'infections inflammatoires par *T. mentagrophytes*, la résistance aux antifongiques **et surtout** une utilisation irrationnelle de **crème à base de corticostéroïdes à forte dose** sur une longue durée (quelques mois à années) contenant plusieurs antimicrobiens (notamment un antifongique et un antibactérien) ont contribué à cette épidémie (26 ; 27 ; 28 ; cf figure 8). Sur base de différentes études épidémiologiques en Inde menées entre 2004 et 2018 (29 ; 30 ; 31), il a été observé une inversion progressive de la fréquence respective de *T. rubrum* et des espèces de la série *T. mentagrophytes*, avec *T. indotineae* apparue comme l'espèce la plus fréquente entre 2017 et 2019 dans toutes les régions d'Inde où il a été observé (32).

En ce qui concerne la Belgique, les principales espèces étiologiques de la teigne du cuir chevelu sont *M. audouinii* et *T. soudanense* alors que *T. rubrum* reste l'agent majoritaire des onychomycoses et de dermatophytoses de la peau, suivi de *T. interdigitale* (33).

1.8 Mécanismes d'adhérence cutanée et d'invasion des dermatophytes

Les mycoses superficielles sont principalement causées par des dermatophytes anthropophiles et zoophiles qui infectent la couche cornée de la peau, ongles, plumes et autres structures kératinisées dérivant de l'épiderme. Des études *in vitro*, *in vivo* et *ex vivo* ont démontrées que les dermatophytes induisent diverses activités kératinolytiques, protéolytiques et lipolytiques pour induire des lésions cutanées, notamment par la libération des sérines et métalloprotéases, impliquées dans le catabolisme des protéines extracellulaires de la peau (cf figure 9) Selon la zone affectée, le nom clinique des lésions est « *tinea* » ou teigne, associé au site d'infection (cf figure 10 ; 34 ; 35)

Le type et le degré de sévérité de l'infection sont dépendants de l'espèce fongique impliquée, du statut immunitaire de l'hôte et de l'intégrité de la barrière cutanée. L'apparition d'une dermatophytose fait suite à l'adhérence du champignon au niveau du tissu externe de l'hôte, tel que l'épiderme, par des adhésines présentes sur la paroi fongique. Différentes molécules peuvent intervenir, comme des protéases appartenant principalement à deux grandes familles :

- **Les subtilisines** (protéases à sérine), comme la subtilisine Sub3, retrouvée notamment chez *M. canis*, elles servent de protéines d'adhésion aux structures kératinisées chez l'hôte (36).
- **Les fungalysines** (métalloprotéases ou Mep), en particulier la famille Mep M36 (allant de MEP1 à MEP5), qui sont des facteurs de virulence importants de *T. mentagrophytes* notamment lors de l'invasion de l'hôte, puisqu'elles influencent le niveau de sécrétion de kératinase (cf figure 11).

Une fois fixés, les dermatophytes initient la germination des arthroconidies et la pénétration profonde des hyphes à travers le tissu dermique afin d'éviter leur élimination par l'excrétion des cellules mortes de l'hôte. Chez *T. mentagrophytes*, des

projections fibrillaires ont été observées (*in vitro*), celles-ci pénètrent après quelques jours dans les couches profondes du derme, ce qui augmente la surface de contact, confère une meilleure adhérence et une plus importante acquisition de nutriments. Finalement, une fois l'intégrité de la barrière cutanée perdue, les kératinocytes libèrent des peptides antimicrobiens ainsi que des cytokines pro-inflammatoires, stimulant la réponse immunitaire pour résoudre l'infection (37 ; 10).

1.9 Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques des teignes dépendent du type de dermatophyte incriminé, de la zone atteinte ou encore de la réponse immunitaire de l'hôte, se traduisant par différentes lésions.

1.9.1 Onychomycose (*tinea unguium*)

L'infection de l'ongle, appelée onychomycose ou *tinea unguium*, est une infection fongique fréquente de l'unité unguéale dont la prévalence augmente avec l'âge. La majorité des cas de *tinea unguium* (60 à 70%) est causée par des dermatophytes, en particulier *T. rubrum*, suivi de *T. interdigitale*. Cependant, l'infection peut également être provoquée par des levures ou des moisissures non dermatophytes, comme *Aspergillus* spp ou *Candida* spp (38 ; 39 ; 40). Tout élément de l'unité unguéale peut être touché par l'infection, pouvant aller jusqu'à une atteinte complète. Les onychomycoses sont classées selon leur aspect clinique :

- La plus fréquente est l'**onychomycose sous-unguéale distale et latérale** qui correspond à une invasion du lit de l'ongle et de la face inférieure de la tablette unguéale, se traduisant par une hyperkératose et une dépigmentation jaunâtre ou blanchâtre.
- Ensuite, on trouve l'**onychomycose sous-unguéale proximale**, suivie de l'**onychomycose unguéale sous-distale**, qui correspondent respectivement à une pénétration fongique de la plaque de l'ongle nouvellement formée à travers le pli proximal de l'ongle et à une pénétration fongique à travers toute l'épaisseur de l'ongle sans affecter le lit. Ces deux dernières onychomycoses affectent principalement les personnes immunodéprimées.
- Enfin, le résultat final de l'un des quatre types d'onychomycoses mentionnés ci-dessus correspond à l'**onychomycose dystrophique totale**, qui se manifeste par une destruction complète de la plaque unguéale (41 : cf figure 12).



Figure 13 : Dermatophytose de l'avant-bras

Dermatophytose localisée au niveau de l'avant-bras (A). Des plaques érythémateuses nummulaires accompagnées de pustules sont observables.

B) Plaque circulaire (ovoïde), squameuse et érythémateuse avec un bord d'attaque irrégulier observable sur l'avant bras.

Référence : Soares *et al.*, 2021 ; Leung *et al.*, 2020

Classification de l'onychomycose	Aspect clinique
Onychomycose sous-unguéale distale et latérale (<i>T.rubrum</i>)	
Onychomycose sous-unguéale proximale (<i>T.rubrum</i>)	
Onychomycose dystrophique totale (<i>T.rubrum</i>)	

Figure 12: Classification & aspect des onychomycoses (tinea unguium)

Classification et aspect clinique des différentes onychomycoses qui peuvent affecter une partie ou l'entièreté de l'ongle.

Référence : figure personnelle , illustrations tirées de Hay, Baran, 2010

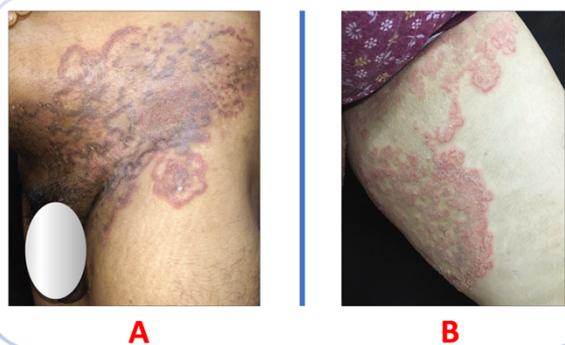


Figure 14 : tinea corporis sous forme de plaques

Multiples lésions annulaires ayant fusionnées pour former une plaque au niveau de l'aine (A) et de la cuisse (B).

Référence : Verma *et al.*, 2021



Figure 16: Tinea pedis

Teigne du pied affectant la zone située entre les 3 et 4^{ème} espaces interdigitaux.

Référence : Aaron, 2022



Figure 15: teignes étendues causés par *T. indotineae*

Les lésions se caractérisent par des plaques annulaires à bords relevés, avec une région centrale squameuse touchant l'aine (a) et les fesses (b) avec une pigmentation proéminente au niveau des zones atteintes. En c) plaques érythémato-squameuses qui convergent sur une grande surface, limité à la peau. En d) érythème annulaire centrifuge du tronc après l'administration de corticostéroïdes topiques et oraux.

Références :

a et b : Chowdhary *et al.*, 2022

c : Uhrlaß *et al.*, 2022

d : Dellièrre *et al.*, 2022

1.9.2 Teigne de la peau glabre et pieds (*tinea corporis & pedis*)

Tinea corporis, également connue sous le nom d'herpès circiné ou roue de Sainte-Catherine est une dermatophytose superficielle de la peau glabre, principalement induite par *T. rubrum*, suivie de *T. mentagrophytes* induisant des lésions inflammatoires (42 ; 43).

Les manifestations cliniques se présentent généralement par une plaque circulaire (ou ovoïde) squameuse et érythémateuse, qui est bien délimitée avec un bord d'attaque surélevé. La lésion débute généralement par une tâche squameuse qui s'étend de façon centrifuge en s'effaçant au centre pour former une lésion annulaire. Le pourtour de la lésion est habituellement circulaire et irrégulier et occasionnellement papuleux et peut fusionner pour former des motifs polycycliques (44 ; figures 13 et 14).

En ce qui concerne la série *T. mentagrophytes*, contrairement aux infections causées par *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale*, *T. indotineae* présente souvent des lésions cutanées étendues, avec des lésions squameuses inflammatoires ou hyper-pigmentées et des démangeaisons sévères survenant simultanément, difficile à traiter avec une évolution chronique récurrente (45 ; cf figure 15).

Tinea pedis, également appelé pied d'athlète, est une dermatophytose pouvant affecter environ 10 % de la population mondiale. Cette infection affecte le pied, en particulier les espaces inter-orteils ou la plante des pieds. La majorité des infections fongiques des pieds sont causées par *T. rubrum* (70 %) suivi de *T. interdigitale* (46). Les lésions cliniques de *tinea pedis* sont principalement caractérisées par une dermatite intertrigineuse des orteils, également appelée intertrigo, qui se manifeste par une desquamation de la peau accompagnée de macération et de fissuration, avec comme zones les plus touchées les fentes sous et inter-orteils (cf figure 16).

Les régions affectées par le *tinea pedis* se caractérisent par une rougeur de la peau (érythème) ainsi que des squames blanchâtres et fines, dont trois variantes ont été décrites : les types intertrigineux, mocassin et vésiculobulleux (cf figure 17). De plus, la teigne des pieds peut être une entrée potentielle pour l'invasion bactérienne des tissus sous-cutanés (47).

1.9.3 Teigne du cuir chevelu (*tinea capitis*)

La *tinea capitis*, est une infection fongique affectant le cuir chevelu, et est la forme d'infection fongique la plus courante chez les enfants et les adolescents de moins de 14 ans. Cela peut être expliqué en partie par les changements hormonaux à l'adolescence, le fait que les enfants ont tendance à partager plus facilement des objets de coiffure (peigne, brosse à cheveux, ...), à être moins rigoureux au niveau de l'hygiène personnelle et passent plus de temps dans des environnements collectifs (écoles, piscines ou les terrains de jeux). Les principales espèces étiologiques comprennent *T. tonsurans*, *M. audouinii*, *T. soudanense*, *M. canis*, ainsi que *T. violaceum*. Généralement, la *tinea capitis* entraîne progressivement l'apparition de

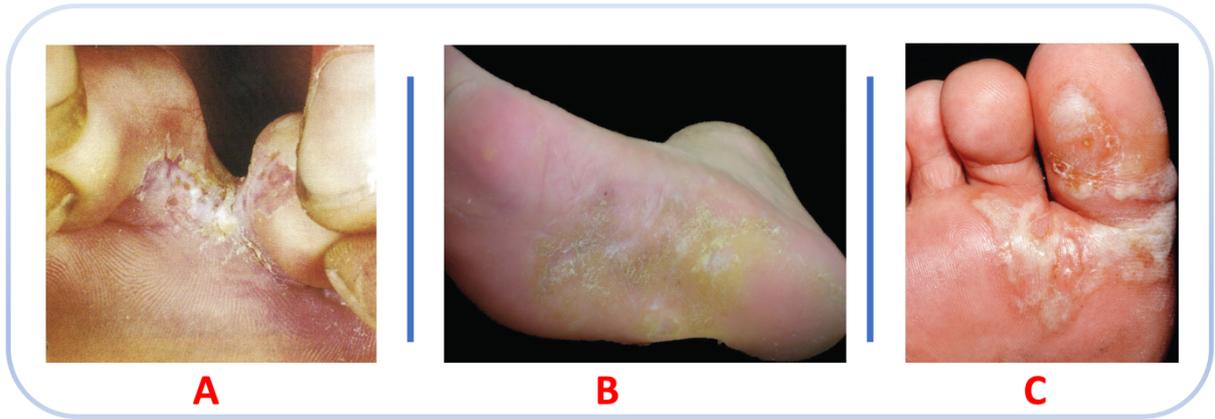


Figure 17: Tinea pedis

Trois variantes de *tinea pedis* ont été caractérisées ;

- Le type **intertrigineux** accompagné de macération, desquamation et fissuration (A).
- Le type **mocassin** (B), affectant la plante du pied, pouvant être squameuse ou inflammatoire.
- Le type **vésiculobulleuse** (C), caractérisée par de l'inflammation, des vésicules, des vésiculopustules ou des bulles.

Référence : Zaidi *et al.*, 2019

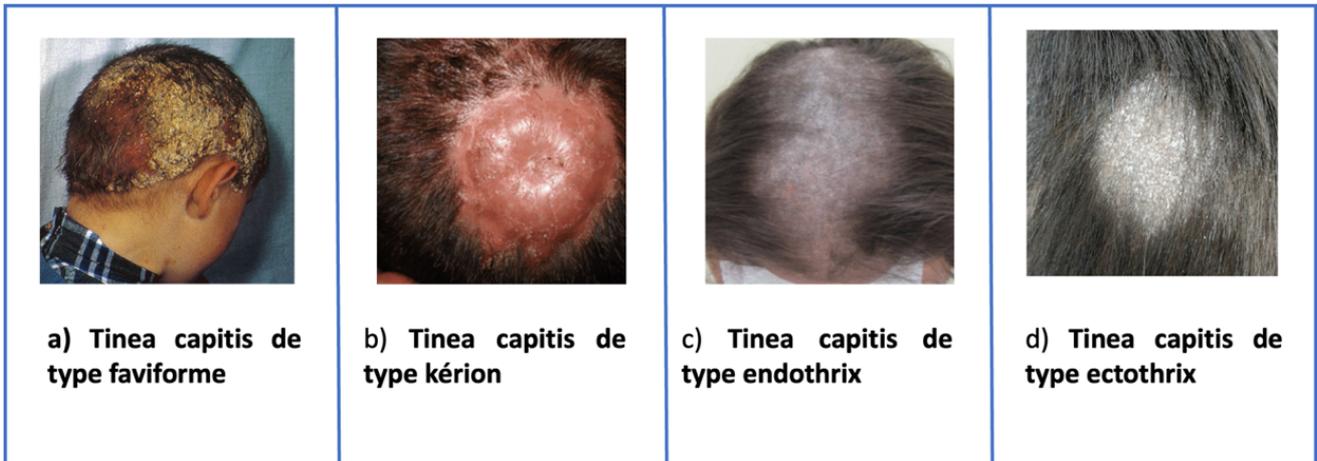


Figure 18: représentation des différents formes de tinea capitis.

Références : a & d) Chabasse et Contet -Audonneau, 2013 ; b) Tirado-Sánchez, Bonifaz,2018 ; c) Peixoto *et al.*, 2019

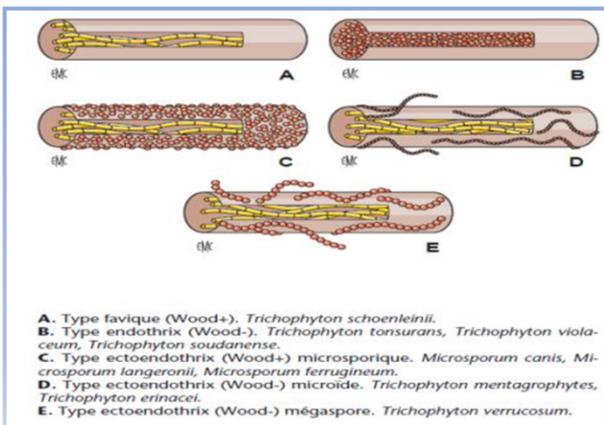


Figure 19 : représentation des différents types d'atteinte pileaire.

Référence : Chabasse et Contet - Audonneau, 2013

lésions érythémateuses, squameuses et alopéciques plus ou moins arrondies au niveau de la zone infectée. Les lésions peuvent être diffuses ou circonscrites, leur taille et leur forme variant selon l'agent pathogène impliqué. Outre les symptômes généraux, des démangeaisons ainsi que des croûtes pelliculaires peuvent accompagner l'infection.

Selon le mode de parasitisme pileaire, plusieurs types de *tinea capitis* peuvent être induites (cf figures 18 et 19). A savoir :

- **Le type faviforme** : qui est une forme assez rare et est uniquement causée par *T. schoenleinii*. Cette forme se caractérise par des amas d'hyphes à la base des cheveux, une alopecie diffuse, des godets faviques et des croûtes jaunâtres friables pouvant atteindre tout le cuir chevelu.
- **Le type kérion (ou suppurées)** : est une forme sévère affectant le cuir chevelu, le dermatophyte affecte l'intérieur du follicule pileux, produisant des hyphes et spores, induisant de l'inflammation et une réaction immunologique (surtout causé par des espèces zoophiles et telluriques telles que *T. mentagrophytes* ou *M. canis*). La présentation clinique comprend des plaques de desquamation avec un processus inflammatoire local intense, un œdème au niveau du cuir chevelu, accompagnée d'une alopecie, de démangeaisons et de pus.
- **Le type endothrix** : le dermatophyte affecte la tige pileaire, les spores fongiques se retrouvent à l'intérieur de la tige du cheveu sans destruction du cuticule (principalement causé par *T. tonsurans*). Le type endothrix est caractérisé par une alopecie diffuse et de lésions squameuses.
- **Le type ectothrix** : le dermatophyte (ex : *M. canis*) se développe à l'intérieur du follicule pileux, les hyphes et spores recouvrent la surface du cheveu avec une destruction du cuticule (48 ; 49).

1.10 Identification des dermatophytes

Le diagnostic des dermatophytoses nécessite l'utilisation de diverses techniques afin d'identifier et confirmer la présence du champignon responsable de l'infection fongique. Autrefois, la microscopie simple et les cultures étaient largement utilisées, mais ces méthodes présentaient des limites en termes de fiabilité. L'évolution des technologies diagnostiques a permis de développer de nouveaux outils de détection se fondant sur la biologie moléculaire pour la

Colorants	Propriétés
Hydroxyde de Potassium (KOH)	Digère la kératine (et autres protéines) et dissocie les cellules kératinisées permettant une meilleure visualisation des hyphes et conidies.
Acide périodique Schiff (PAS)	Colore certains polysaccharides de la paroi cellulaire fongique (ex : hyphes) en fuchsine / magenta.
BLANC DE CALCOFLUOR	Fluorochrome non spécifique réagissant (notamment) avec la chitine , qui sous l'influence d'une fluorescence apparaîtra en vert pomme (filtre d'excitation de 300-412 nm).
Bleu de lactophénol	Ce colorant bleu cible également la chitine et permet de visualiser notamment les hyphes ou conidies
Rouge Congo	Fluorochrome non spécifique réagissant (notamment) avec la chitine la colorant en rouge.

Figure 20: liste de différents colorants pouvant être utilisés lors d'un examen direct d'échantillon au microscope.

Référence : figure personnelle

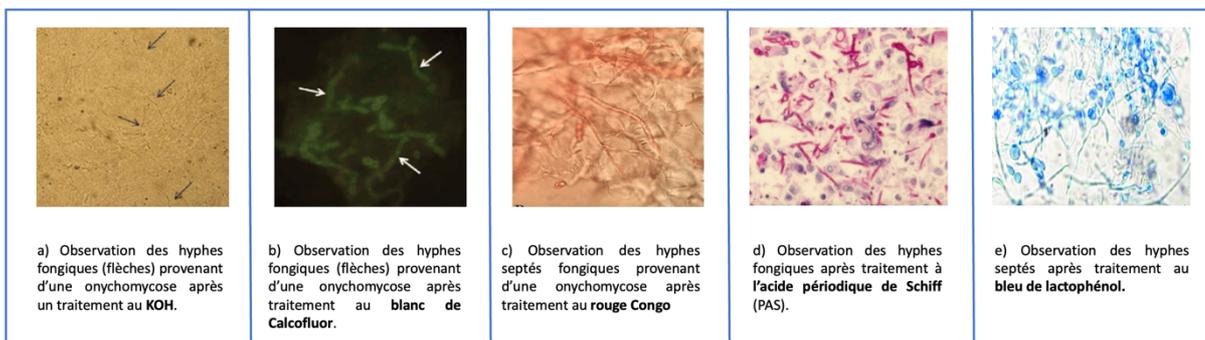


Figure 21 : Représentation de différentes colorations pouvant être utilisées lors d'un examen direct d'un échantillon au microscope.

Références : a et b) Durdu *et al.*, 2017 ; c) Pihet, Govic, 2016 ; d) Choi *et al.*, 2011 ; e) Sonthalia *et al.*, 2014

reconnaissance des dermatophytes, notamment la réaction en chaîne par polymérase (PCR) qui est de plus en plus utilisée (50). Cependant, la génomique de haut débit (NGS) est actuellement considérée comme une méthode encore plus avancée pour l'analyse du génome des dermatophytes (51).

1.10.1 Biopsie et anamnèse des prélèvements

L'étape préalable au diagnostic de l'échantillon consiste en sa collecte et son transport jusqu'au laboratoire d'analyse. Ces étapes conditionnent la qualité de l'échantillon et, par conséquent, la pertinence et la fiabilité de l'analyse. En effet, le prélèvement doit être effectué par du personnel qualifié, récolté en quantité suffisante et prélevé au niveau de la zone active de la lésion (idéalement avant l'administration d'antifongiques). En plus de la biopsie, l'anamnèse du patient peut être demandée ainsi que d'autres informations (coordonnées, âge, sexe, origine ethnique, récents séjours/voyages à l'étranger, animaux de compagnie, pratique sportive, ...) permettant d'orienter le diagnostic et traitement.

1.10.2 Examen direct des échantillons

La culture fongique nécessite généralement quelques jours (entre 4 et 6 jours pour les espèces de la série *T. mentagrophytes* par exemple) pour permettre une croissance fongique. C'est pourquoi, un examen direct (ED) est réalisé afin de confirmer la présence d'un dermatophyte. L'ED consiste en une analyse visuelle du prélèvement au microscope. Afin de réaliser un ED de qualité optimale, il est indispensable d'éliminer la kératine présente dans les prélèvements, ce qui permet une observation plus précise des hyphes et arthroconidies fongiques.

Pour cela, les échantillons sont traités avec des réactifs de clarification tels que l'hydroxyde de potassium (KOH), qui dissolvent la kératine. De plus, le KOH peut colorer les hyphes des dermatophytes en jaune, les rendant plus visibles au microscope. Plusieurs colorants peuvent être utilisés, ciblant différentes structures fongiques afin d'améliorer leur visualisation au microscope (51 ; 52 ; cf figures 20 & 21).

L'examen direct (ED) est donc une méthode simple, rapide et peu coûteuse, qui permet d'apporter une première appréciation de l'agent étiologique (fongique ou non uniquement). La coloration à l'acide périodique de Schiff est par exemple une méthode utilisée au CHU de Liège permettant de mettre en évidence les structures fongiques sur coupe histologique. L'ED reste une méthode assez courante mais comporte des inconvénients, notamment le fait que la technique comporte 5 à 15% de résultats faux-négatifs ou encore la nécessité de réaliser l'examen par du personnel compétent, ce qui n'est pas toujours possible (53).

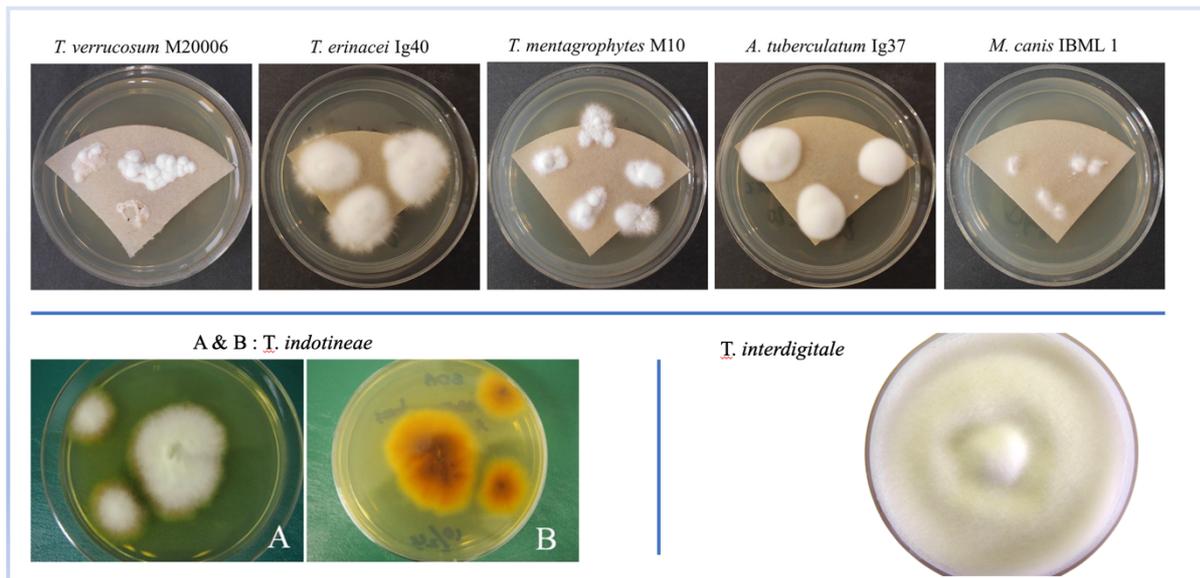


Figure 22 : observation macroscopique de différentes espèces de champignons.

Référence : adapté de Baumbach *et al.*, 2021 ; Kano *et al.*, 2020 ; Pgodoy, 2018

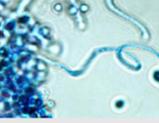
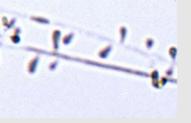
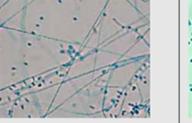
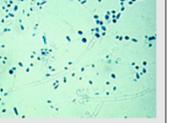
	<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	<i>Trichophyton tonsurans</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Trichophyton verrucosum</i>	<i>Trichophyton equinum</i>
Species and Incidence	Human: 9% (skin, scalp, hair, nails, esp. feet & groin) Dogs: 10% Cats: 1%	Infects only humans: 45% (usually scalp, also skin and nails)	Infects only humans: 41% (usually skin, feet, hands, nails, groin, very rare in hair and scalp) Rare in animals	Cattle: usual Human, horses, sheep: occasional	Human: very rare Horses: usual
Colony Appearance (Top View)	Buff and powdery or white and downy	Velvety with rugose folds Color variable	White to buff, fluffy and downy	White, sometimes yellow or gray Velvety appearance and heaped, smaller colonies	Cream to tan and velvety
Reverse Colony Color (Undersurface view)	Brown to tan (usual), dark red, or yellow	Mahogany to reddish-brown Sometimes yellow or colorless	*Deep red, wine; sometimes brown, yellow or colorless	White, sometimes yellow	Yellow to red-brown
Microscopic Macroconidia (taken from RSM™ and Mycobiotic media)	 Cigar-shaped with thin smoothed walls	 Rare, thin smooth walls, irregular shape Non-diagnostic	 2-8 cells, parallel sides Rarely seen	 *Rare, long, thin and smooth wall Many chlamydospore chains	 Rare, clavate Thin and smooth wall 3 to 5 cells
Microscopic Microconidia (taken from RSM™ and Mycobiotic media)	 * Rare to numerous Round to pyriform Often with coiled or spiral hyphae	 *Variable Branched and tear, clavate or bubble shaped	 *Born singly on hyphae Small, pyriform	 Rare, pyriform to clavate Non-diagnostic	 *Many, on hyphae and pyriform to round
Usual Time (days)	7 – 10	8 – 12	10 – 12	10 – 12, grows best at 37°C	4 – 5

Figure 23 : Tableau d'aide à l'identification microscopique des dermatophytes.

Référence : Hardy Diagnostics

1.10.3 Culture et examen macroscopique des échantillons

La mise en culture des dermatophytes est une étape cruciale pour l'identification de l'espèce de dermatophyte incriminé. Différents milieux de culture sont utilisés afin d'analyser les prélèvements de peau, ongles ou cheveux contaminés par des dermatophytes. Cette étape permet l'identification macro et surtout microscopique du champignon, par l'analyse de différents caractères morphologiques, notamment la texture, taille, forme et la couleur des colonies/spores, ainsi que la pigmentation (cf figures 22 & 23).

La culture consiste à inoculer un échantillon clinique sur un milieu de culture spécifique afin de faire croître les dermatophytes tout en éliminant les bactéries et autres champignons indésirables par l'ajout d'antibiotiques/antifongiques appropriés. Les milieux additionnés d'antibiotiques et/ou antifongiques les plus couramment utilisés pour réaliser l'isolement primaire sont la gélose Sabouraud chloramphénicol (avec ou sans gentamicine) ainsi que le cycloheximide (également appelé actidione). L'actidione inhibe la croissance de la plupart des moisissures ainsi que de certaines levures et favorise donc l'isolement des dermatophytes.

De plus, différents milieux de culture peuvent être utilisés, dont les plus courants comprennent le milieu Sabouraud-Agar, PDA (Potato Dextrose Agar) ou encore le Millet Sabouraud Agar. La température et le temps de culture sont également des facteurs cruciaux, de manière générale, une température comprise entre 25 et 30°C et une incubation durant 5 à 7 jours permettent la croissance des dermatophytes. Enfin, l'identification doit être effectuée par du personnel qualifié et formé avec des connaissances approfondies en mycologie (54).

1.10.4 Examen microscopique des cultures de dermatophytes

Lors d'un examen microscopique, différentes structures fongiques peuvent être observées pour aider à identifier le type de dermatophyte présent. Les principales étapes de l'examen microscopique consistent en premier lieu au repiquage de l'échantillon sur un milieu de culture approprié tel que le PDA ou le Sabouraud-agar, suivi d'une incubation à environ 30°C.

La préparation de la lame est ensuite réalisée, elle consiste à déposer généralement par la méthode du ruban adhésif (ou méthode de scotch tape) un fragment de l'échantillon sur une lame de verre propre pour permettre sa visualisation au microscope. Le rajout d'une goutte de bleu de lactophénol est recommandé, il fixe et conserve les structures morphologiques afin d'améliorer la qualité de l'observation. Les structures morphologiques principales étudiées afin d'identifier les dermatophytes comprennent les hyphes septés, les arthrospores, les macro et microconidies. Au sein de la catégorie des dermatophytes, quatre genres sont distingués en fonction des caractéristiques de leurs macronidies (spores pluricellulaires), à savoir, *Trichophyton*, *Microsporum*, *Epidermophyton* et *Nannizzia* (55).

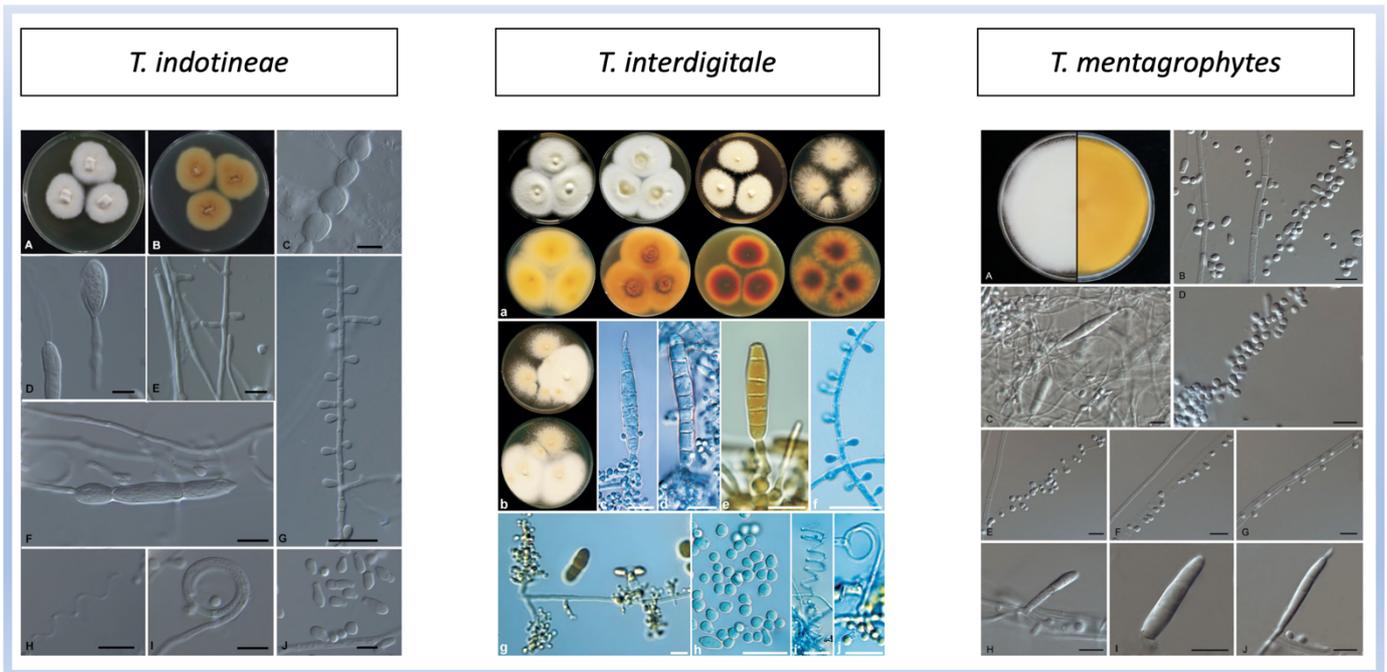


Figure 24 : observation microscopique des différentes espèces de la série *T. mentagrophytes*.

Référence : [Atlas of clinical fungi S. De hoog.](#)

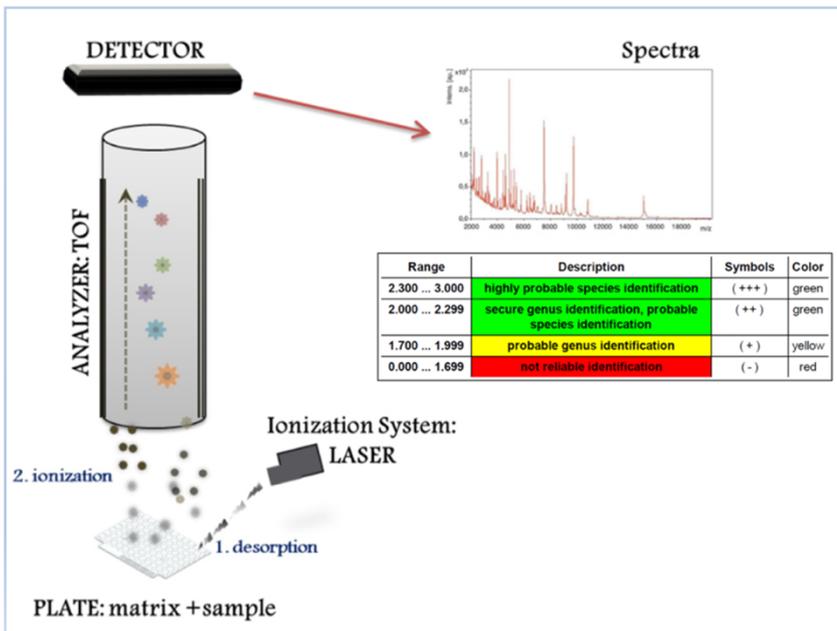


Figure 25 : Principe du spectromètre de masse MALDI-TOF

Après ionisation de l'échantillon par le laser, des ions sont produits et accélérés par une différence de potentiel électrique. Les ions sont ensuite séparés en fonction de leur rapport masse-sur-charge (m/z) dans un tube à temps de vol et détectés à la fin du tube, produisant un spectre de pics caractéristiques correspondant aux différents m/z des ions présents dans l'échantillon. Les ions les plus légers atteignent le détecteur en premier. Ce spectre de masse peut être utilisé pour identifier les protéines présentes dans l'échantillon.

Référence : adapté de [Torres-sangiao et al., 2021](#)

Cependant, certaines espèces comme celles appartenant au complexe *T. mentagrophytes* sont difficilement discriminables au microscope puisqu'elles présentent les mêmes caractéristiques phénotypiques (cf figure 24).

Si la souche demeure non identifiable (stérile ou présente des critères culturels macro et microscopiques atypiques), il est possible de repiquer les souches dans des milieux favorisant la conidiogénèse (formation des spores) et/ou la production de pigments caractéristiques. Les milieux les plus fréquemment utilisés sont le milieu de Borelli (milieu lactrimel) qui stimule la fructification de la majorité des dermatophytes et renforce la production de pigments, le milieu au Malt, la gélose PDA, ou encore le milieu de Takashio (constitué de milieu Sabouraud dilué forçant la sporulation).

Cependant, l'observation microscopique présente des limitations, telles que le temps d'incubation de la culture qui est chronophage, le fait que certaines espèces ne sporulent pas (ou peu) en culture, que certaines souches génétiquement proches présentent des caractéristiques phénotypiques très éloignées ou que, à l'inverse, des souches génétiquement éloignées présentent des caractéristiques phénotypiques proches et/ou des lésions cliniques similaires. De plus, il existe une certaine subjectivité dans l'identification, car celle-ci est influencée par l'expérience et la compétence du technicien qui effectue l'examen. C'est pourquoi la combinaison de méthodes conventionnelles et de techniques de biologie moléculaire est nécessaire pour fournir une discrimination plus précise et détaillée des différentes souches de dermatophytes (55 ; 56).

1.10.5 Spectrométrie de masse MALDI-TOF

Le MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight) est une technique avancée de spectrométrie de masse largement utilisée en microbiologie pour une identification rapide et précise des micro-organismes présents dans les échantillons cliniques. Cette technique a été conceptualisée dans les années 1970 et développée à la fin des années 1990 (57). Le principe du spectre de masse MALDI-TOF consiste à exciter et dissocier les molécules d'un échantillon déposé sur une plaque de support enduite d'une matrice (ex HHCA) à l'aide d'un faisceau laser afin de former des ions chargés qui seront vaporisés (transformés en phase gazeuse). Les ions sont ensuite accélérés dans un tube de vol via un champ électrique où ils parcourent alors une distance connue durant un temps donné (time of flight). Ils seront dès lors séparés en fonction de leur rapport masse sur charge (m/z) pour être détectés par un détecteur. Enfin, la masse de chaque ion sera mesurée et enregistrée afin de former un spectre de masse de la protéine d'intérêt. Ce spectre sera ensuite comparé (via un algorithme de recherche) à un spectre de référence et un score de similitude sera rendu. Plus le score est élevé (maximum 3) et plus la similitude entre le spectre obtenu et le spectre de référence est similaire, ce qui augmente la probabilité d'identification et augmente donc la précision et fiabilité du résultat. (58 ; 59 ; cf figure 25). Bien que cette technique soit considérée comme le gold-standard pour l'identification des micro-organismes en bactériologie, elle présente plusieurs limitations concernant l'identification des champignons. Les facteurs ayant un impact majeur sur les performances d'identifications des dermatophytes comprennent en particulier la qualité, le nombre et la variabilité de spectres présents dans la base de données.

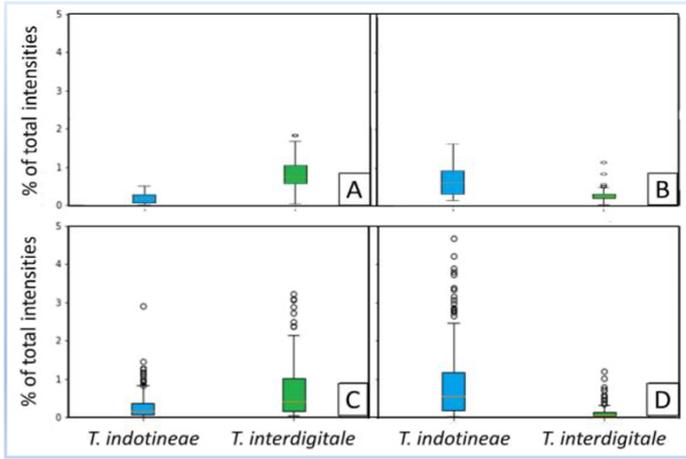


Figure 26 : Distribution des pics de masse discriminants pour les espèces de la série *T. mentagrophytes*

La présence et absence respectivement des pics à 6834/6845 Daltons / Da (entre 7 à 10j de croissance) permettent la distinction entre *T. indotineae* et *T.mentagrophytes/interdigitale*. Tous les spectres appartenant à *T. indotineae* présentent le pic à 6845 et ne présentent pas un pic à 6834. De la même façon, le pic à 10,680 est spécifique à *T. indotineae* et celui à 10,634 non spécifique à *T. indotineae*.

La boîte à moustache représente la distribution des pics de masse discriminants, on retrouve en :

- A) pic à 6834 Da / B) pic à 6845 Da
- C) pic à 10,634 Da / D) pic à 10,680 Da

Référence : Normand *et al.*, 2022

Figure 27 : Différentes étapes de la PCR pour la détection des dermatophytes

A) La PCR nécessite trois étapes principales, la dénaturation de l'ADN (95°C), l'hybridation des amorces d'ADN (60°C) et l'élongation de l'ADN réalisée par l'ADN polymérase. Le cycle est répété 35x et les amplicons (produits de réaction) sont conservés à 4°C (le temps sur le schéma n'est pas représentatif de la réalité). B) Analyse des amplicons par électrophorèse. C) Vérification de la taille des amplicons (de gauche à droite) ITS, Efl- α , and β -tubuline, approximativement de 660pb, 500pb et 750 pb respectivement. Trois bandes sont observables sur la figure (c), confirmant le bon déroulement de la PCR.

Références : adapté de Yoon *et al.*, 2013 ; Precast Agarose Gels | Thermo Fisher Scientific - IE, n.d. ; Garibyan, Avashia, 2013 ; Biorender ; Rezaei-Matekholaei *et al.*, 2014

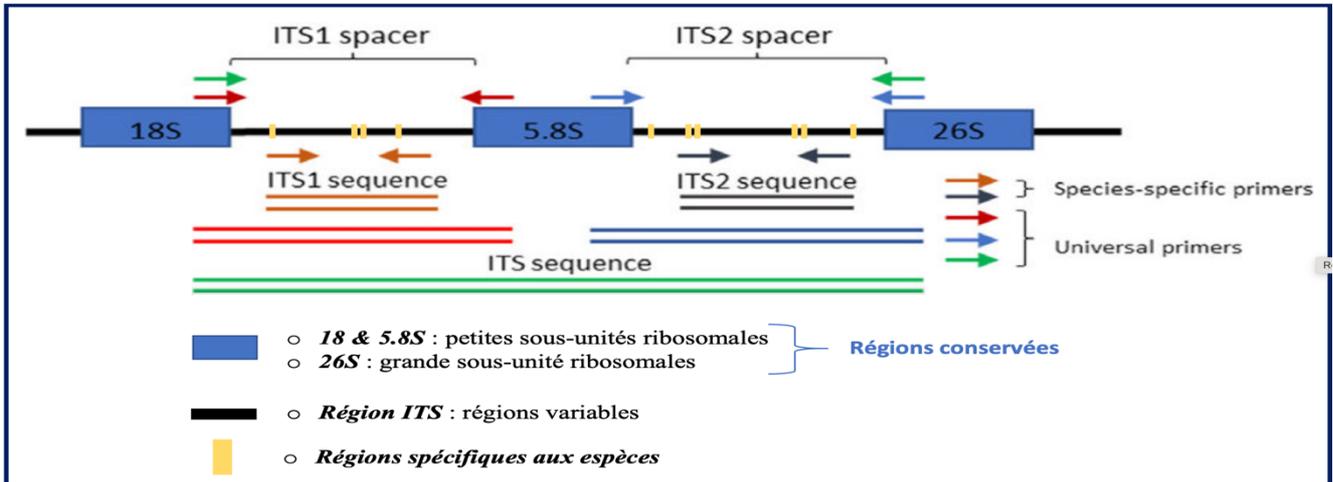
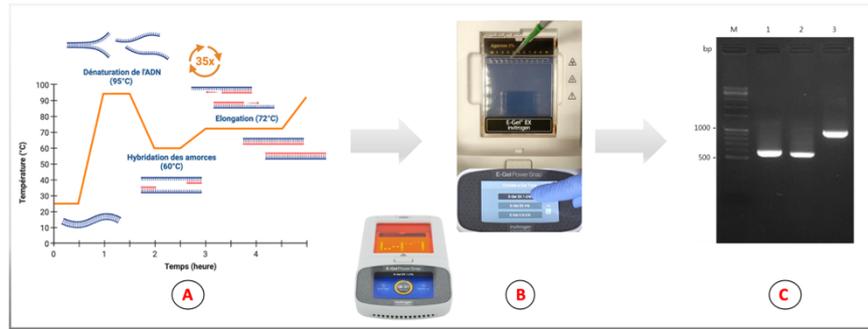


Figure 28 : Schéma décrivant la région de l'Internal Transcribed Spacer (ADN ribosomal nucléaire)

La région ITS est constituée des régions ITS1 et IT2. La région ITS1 se situe entre les petites sous-unités ribosomales 18S et 5.8S tandis que la ITS2 se situe entre la région 5.8S et 26S. Des amorces peuvent être utilisées afin de d'amplifier toute la région ITS ou une partie (cf flèches). Les régions 18S, 5.8S et 26S sont assez conservées tandis que les régions ITS sont des régions non fonctionnelles, sujettes à des mutations évolutives, qui sont spécifiques d'une espèce. C'est pourquoi, leur séquençage est réalisée à des fins d'identification d'espèces.

Référence : adapté de Orhan, 2021

De plus, la discrimination par le MALDI-TOF est rendue plus complexe concernant les espèces fort apparentées, notamment pour les espèces du complexe *T. mentagrophytes*, ce qui peut être expliqué par le fait qu'elles présentent des protéines étroitement liées biaisant l'identification (60 ; 61 ; 62).

Cependant, une récente étude réalisée par Normand et al ont démontré qu'une distinction entre *T. indotineae* et *T. mentagrophytes / interdigitale* était possible par MALDI-TOF, en ciblant des pics de masse spécifiques dans un arbre MALDI-TOF MS distant, permettant d'obtenir plus de 90% d'identifications correctes, après avoir amélioré la base de données spectrales (21 ; cf figure 26).

1.10.6 Réaction en chaîne par polymérase (PCR)

La technique de la PCR (Polymerase Chain Reaction) est issue de la biologie moléculaire et permet la détection et l'amplification de séquences génomiques spécifiques à partir d'un échantillon biologique. Cette technique est utilisée en microbiologie pour la détection des dermatophytes en utilisant des amorces qui se lient spécifiquement à une séquence génomique cible, afin de permettre son amplification. Cette technologie implique plusieurs étapes afin d'amplifier le gène d'intérêt. En effet, une dénaturation est requise afin de séparer les deux brins d'ADN, s'en suit l'hybridation des amorces et le cycle d'amplification impliquant une enzyme thermostable (Taq polymérase) dont le rôle est d'ajouter des nucléotides afin d'étendre le brin complémentaire d'ADN. Plusieurs cycles sont effectués, ce qui permet une amplification exponentielle de l'ADN et les amplicons sont analysés sur un gel d'électrophorèse (cf figure 27).

Différents gènes peuvent être ciblés afin d'identifier les dermatophytes. Dès les années 90, l'ADN ribosomique (ADNr) est devenu la cible privilégiée pour la discrimination d'espèces fongiques, en particulier **les régions ITS** situées entre les petites sous-unités 18S et 5.8S, ainsi que la grande sous unité ribosomique 28S (cf figure 28). Les régions ITS1 et ITS2 sont de bonnes cibles car bien que ces régions soient transcrites, elles ne codent pour aucune protéine, et sont donc plus susceptibles de subir des mutations évolutives, contrairement aux sous-unités 18S, 5,8S et 28S, qui sont relativement conservées et donc moins discriminantes (63). Après amplification des régions ITS, les amplicons sont analysés sur gel d'électrophorèse et un séquençage Sanger est réalisé (cf figure 27). D'autres régions peuvent être ciblées à des fins d'identification comme le gène de la chitine-synthase, le gène de la bêta-tubuline ou encore le **facteur d'élongation de la traduction Efl- alpha** (64 ; 65). Par exemple, la distinction entre *T. indotineae* et *T. mentagrophytes / interdigitale* nécessite l'alignement des séquences pour lesquelles toute la région ITS est nécessaire (66).

Cependant, cette méthode présente des limites. En effet, certains dermatophytes très apparentés ne diffèrent que par une seule base (ou sont très proches) au niveau de l'ITS 1, rendant l'identification difficile (67 ; 68).

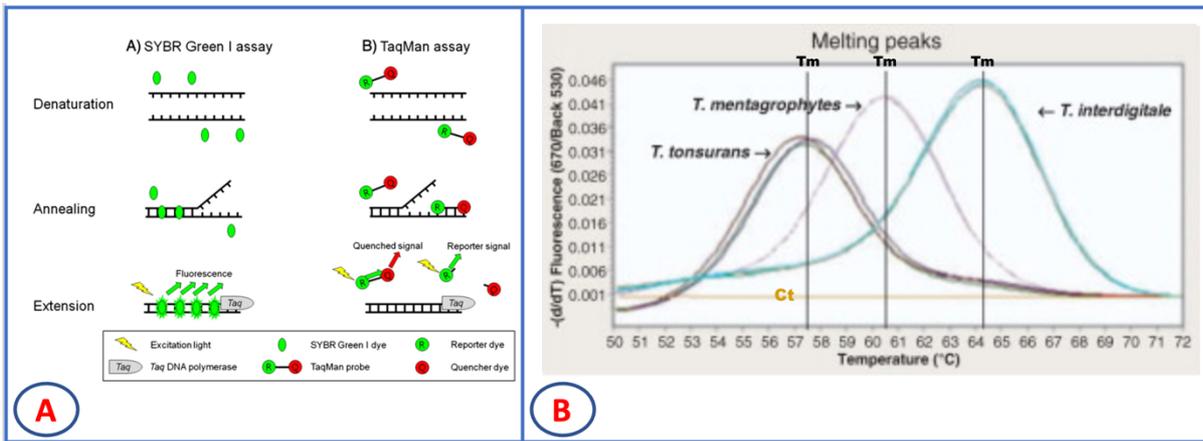


Figure 29 :

A) Schéma des sondes TaqMan et SybrGreen. Le CHU de Liège utilise le Lighcycler480 recourant aux sondes TaqMan, marquées avec un fluorophore à l'extrémité 5' et un quencher à l'extrémité 3'. Pendant la PCR, la Taq polymérase copie l'ADN cible et clive le quencher (par son activité 5' exonucléase) du fluorophore, permettant à la fluorescence d'être détectée. La fluorescence est mesurée à chaque cycle pour quantifier l'ADN/ARN dans l'échantillon.

B) Les pics/courbes de fusions correspondent à la T_m des amorces. Chaque T_m étant spécifique aux espèces, leurs analyses permettent de distinguer les différentes espèces. Le C_t est le nombre de cycles nécessaires pour atteindre un seuil de fluorescence spécifique, il est notamment utilisé pour mesurer la quantité d'ADN cible dans un échantillon.

Référence : adapté de : Kim et al., 2013 ; Ndiaye et al., 2021 ; Mészáros, 2022

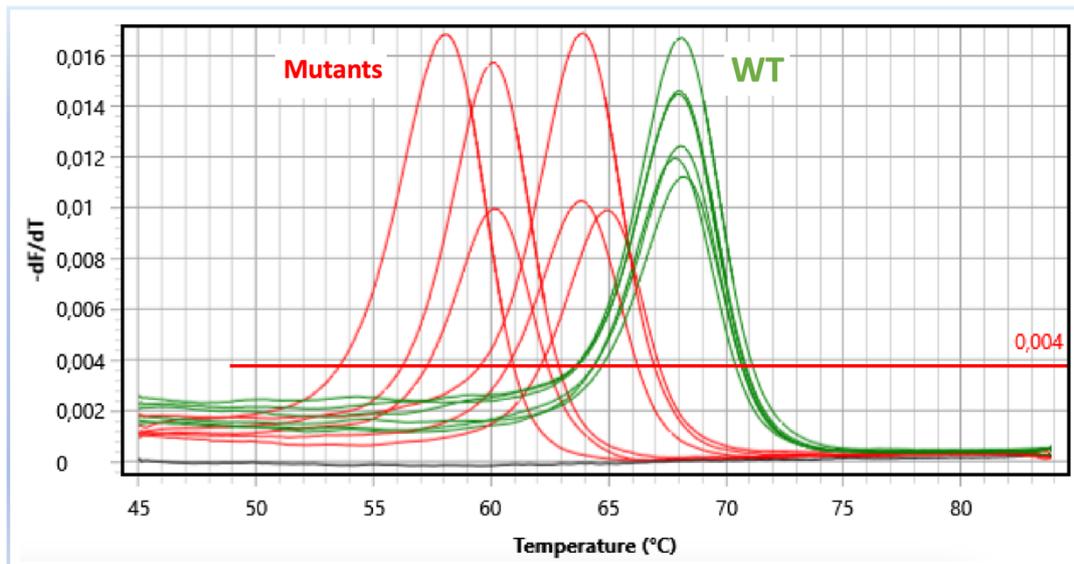


Figure 30 : Représentation graphique des courbes de fusions DermaGenius

Les différents pics représentent la différenciation entre les souches de type sauvages en vert (WT) des mutants en rouge pour le gène de la SQLE.

Référence : adapté de Singh et al., 2021

D'autres raisons telles que l'absence d'holotype dans les bases de données servant de référence ou encore des erreurs présentes au sein de séquences déposées dans les bases de données ont poussé les scientifiques à concevoir d'autres approches, notamment l'approche phylogénétique et en combinant des données moléculaires, écologiques, phénotypiques et de cycle de vie pour établir avec certitude la validité de l'identification des dermatophytes (18).

Il existe plusieurs variantes de la PCR, notamment la PCR en temps réel (qPCR), qui permet de quantifier la quantité d'ADN amplifiée en temps réel en utilisant des sondes fluorescentes (Taq Man ou Sybr Green). Un exemple est la PCR DermaGenius, utilisée au CHU de Liège pour détecter les dermatophytes courants, tels que *T. mentagrophytes/interdigitale*, *T. rubrum*, *M. canis* ou encore *Candida albicans* à partir d'échantillons de cheveux, peau et ongles, en utilisant des sondes TaqMan et sans passer par une étape de culture. La PCR DermaGenius est une technique permettant la détection simultanée de plusieurs espèces de dermatophytes, fondée sur l'utilisation d'amorces spécifiques ciblant les régions ITS (69) où l'interprétation est réalisée par l'analyse des courbes de fusion.

Lors des cycles initiaux, aucune fluorescence n'est lue puisque celle-ci se confond avec le bruit de fond. Le point auquel la fluorescence dépasse le bruit de fond est appelé cycle de quantification (Ct) et correspond à une mesure du nombre initial d'ADN matrice. L'augmentation de la fluorescence est proportionnelle à la quantité d'amplicons produite. Au fur et à mesure que la température augmente, les doubles brins d'ADN se dissocient, ce qui entraîne une diminution de la fluorescence (par le détachement des sondes fluorescentes). Cette étape est reflétée par la réalisation d'une courbe de fusion à la fin des étapes de PCR en faisant varier la t° de 45°C à 75°C généralement, ce qui permettra le calcul de la température de fusion (Tm) spécifique de la séquence génique et donc de l'espèce de dermatophyte (cf figure 29).

Une courbe de fusion est générée en traçant le $-\Delta F / \Delta T$ (une courbe représentant le changement de fluorescence / changement de température). Finalement, puisque les Tm sont spécifiques à chaque espèce (dépend de la longueur et de la composition en bases de la séquence), l'analyse de celles-ci permettent d'identifier l'espèce d'intérêt. De plus, une mutation au sein d'un gène d'intérêt modifie également la Tm, ce qui permet de détecter des variants / mutants au sein d'un gène donné, ce qui est notamment mis en pratique dans le KIT Dermagenius resistance où le calcul du Tm permet de distinguer un gène muté pour la squalène epoxydase (SQLE) d'un gène sauvage (cf figure 30).

La PCR offre une multitude d'avantages notables, tels qu'un diagnostic rapide et précis (en général, en 48 heures sans avoir besoin d'attendre la culture), sa sensibilité, sa capacité à traiter un grand nombre d'échantillons simultanément, la minimisation des contaminations grâce à l'automatisation et à la réaction qui se déroule dans un environnement fermé et la simplicité d'utilisation. Cependant, la PCR peut également présenter des inconvénients, notamment le risque de produire des résultats faussement positifs en raison de sa haute sensibilité (en amplifiant des contaminants présents dans l'échantillon), sa spécificité limitée, qui dépend de la sélection des amorces et des sondes utilisées

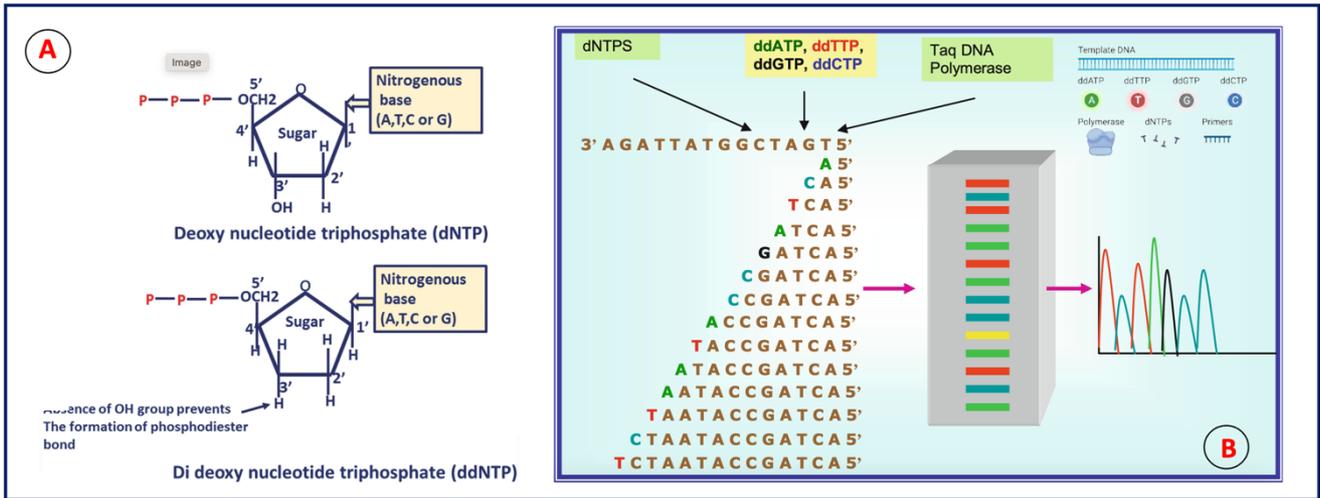


Figure 31 : Séquençage selon la méthode Sanger.

A) La méthode de séquençage Sanger utilise des didésoxynucléotides (ddNTPs) comme terminateurs de chaîne. Les ddNTPs ne possèdent pas de groupement OH en position 3', ce qui empêche la formation de liaisons phosphodiester provoquant ainsi l'arrêt de la synthèse. Les différents brins d'ADN de longueurs différentes sont séparés par électrophorèse sur un gel d'acrylamide, puis lus à l'aide d'un laser qui excite les molécules fluorescentes attachées aux ddNTPs (une couleur par base). Les signaux de fluorescence sont détectés et enregistrés pour chaque base, puis un traitement informatique est utilisé pour déchiffrer la séquence de l'ADN à partir des pics de fluorescence.

Sources : (Dey, 2022 ; Verma et al., 2017)

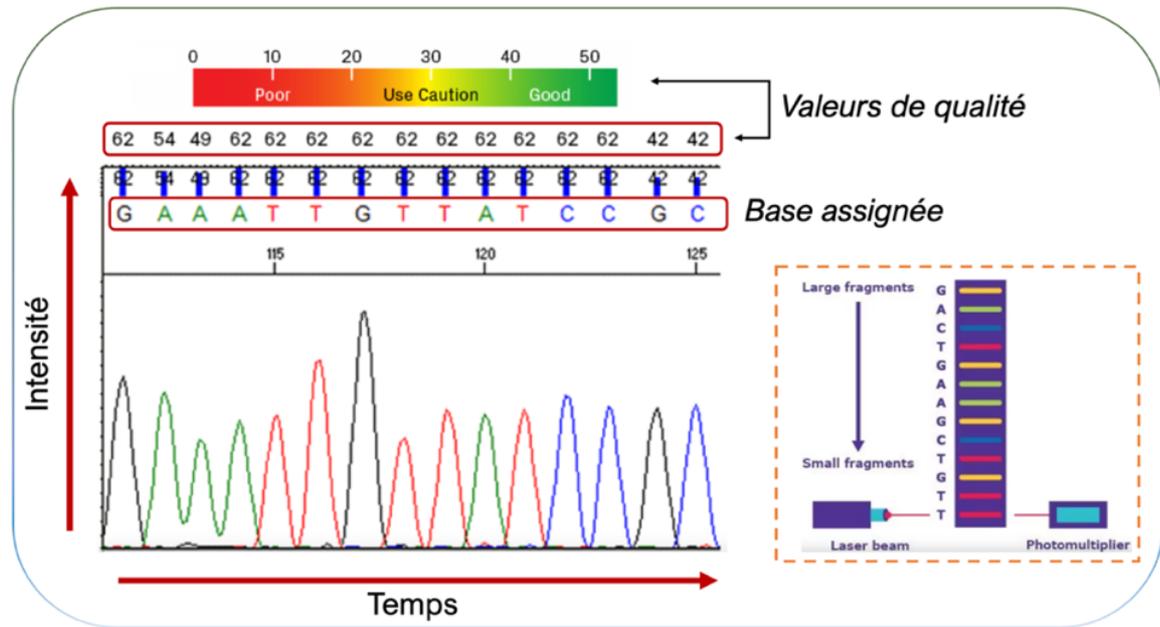


Figure 32 : Chromatogramme Sanger.

L'identification des nucléotides est rendue possible par l'excitation des fluorophores liés aux bases. Le signal lumineux émis est ensuite amplifié par un photomultiplicateur avant d'être capté par un détecteur de fluorescence. Les données numériques enregistrées sont traitées par un logiciel informatique, qui les transforme en une série de pics (correspondant à chaque nucléotide) sous forme d'un chromatogramme. De plus, un score de qualité (VQ) est attribué à chaque pic. Ce score est lié à l'erreur de l'appel de base (de façon logarithmique), et correspond à la possibilité que la base nucléotidique séquencée puisse être incorrectement identifiée, permettant ainsi de vérifier la fiabilité de la séquence obtenue (en général, sa formule est de type Probabilité d'erreur = $10^{-(VQ/10)}$). Les VQs supérieurs à 20 sont considérés comme satisfaisants, car ils reflètent une haute mesure de confiance dans la base nucléotidique séquencée. Ces VQs sont particulièrement utiles pour détecter et corriger les erreurs de séquençage et les variations de qualité des données, assurant ainsi la fiabilité et la précision des résultats obtenus.

Source : Azenta Life Sciences, *Analyzing sanger sequencing data*, 2021

De plus, la PCR peut détecter de l'ADN provenant de dermatophytes vivants ou morts, ce qui signifie qu'elle ne peut être utilisée pour le suivi post-traitement. Finalement, bien que la PCR présente des avantages indéniables, il est important de souligner que la combinaison de la PCR avec des méthodes conventionnelles pour l'identification des dermatophytes reste essentielle (50 ; 70 ; 71).

1.10.7 Séquençage Sanger

Le séquençage de l'ADN a connu des avancées significatives au fil des ans, en particulier grâce à la méthode Sanger, développée par le biochimiste Frederick Sanger dans les années 70, qui vise une approche par synthèse enzymatique. La méthode Sanger a été largement utilisée pendant des décennies pour séquencer l'ADN jusqu'à l'arrivée de technologies plus avancées telles que le séquençage de nouvelle génération (NGS).

Le séquençage Sanger débute par la purification de l'ADN suivie de l'amplification par PCR. Le séquençage à proprement parlé débute par la préparation du mix (globalement identique à celui d'une PCR classique) mais dont la particularité est l'ajout de didéoxynucléotides fluorescents (ddNTP) agissant comme des terminateurs irréversibles. Quatre tubes sont préparés, chacun contenant un des quatre ddNTP fluorescent qui sont incorporés de manière fortuite dans la chaîne d'ADN en croissance par la polymérase. Contrairement aux nucléotides, les ddNTPs n'ont pas de groupe hydroxyle (OH) à leur extrémité 3', ce qui empêche la synthèse ultérieure de la chaîne. De cette manière sont obtenus des fragments de différentes longueurs qui sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire sur gel. Une fois l'électrophorèse terminée, le gel est soumis à une lumière UV ou un scanner laser pour visualiser les bandes de fragments d'ADN marqués. Le signal est ensuite envoyé à un ordinateur qui l'enregistre sous forme de chromatogramme, et analyse ensuite les différents pics pour déterminer la séquence d'ADN correspondante (72 ; 73 ; cf figures 31 & 32).

De manière générale, la méthode Sanger permet d'obtenir des séquences de longueur comprise entre 200 et 850 paires de bases (74). Cependant elle présente plusieurs limitations, puisqu'une PCR au préalable est nécessaire, cela peut entraîner des erreurs de séquence lors de l'amplification, des difficultés à séquencer des régions répétitives et/ou des SNPs (nucléotides polymorphisme) pour de longues séquences (+/- 900 pb), une possible contamination croisée de l'ADN durant la PCR, le fait que la méthode soit relativement chronophage et dans certains cas assez coûteuse ou encore son faible débit car elle ne permet l'amplification que d'un fragment à la fois (75 ; 76). Une solution trouvée pour remédier à ces contraintes est le séquençage de nouvelle génération (NGS) considérée comme une approche de seconde génération.

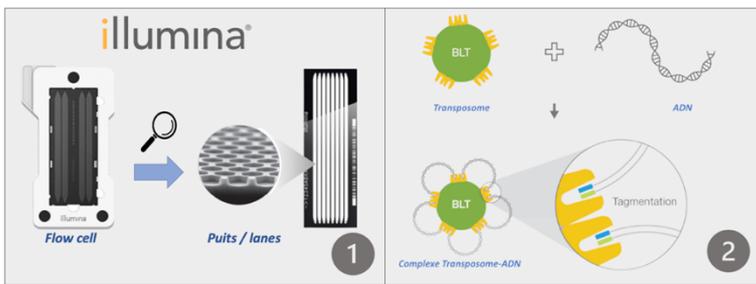


Figure 33 : Plaque Illumina & Tagmentation.

- 1) Représentation de la plaque de verre ou « flow cell », constituée de milliers de puits ou « lanes »
- 2) Illustration d'un transposome résultant de l'association entre l'enzyme transposase et d'un transposon .

Sources : adapté de : Illumina Patterned Flow Cell Technology, 2023 s. d.-b et Illumina DNA PCR-Free Prep | For sensitive WGS applications, s. d.

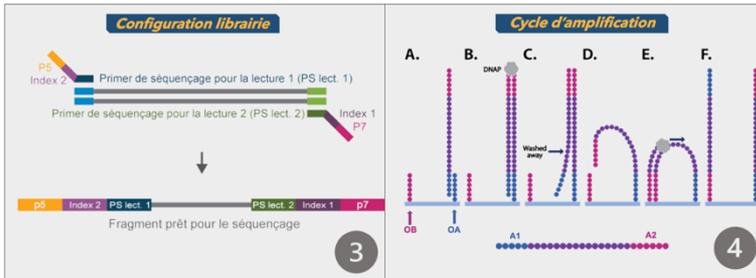


Figure 34 : Préparation de la librairie et représentation du cycle d'amplification.

- 1) Préparation de la librairie par ajout de divers motifs (adaptateurs, amorces, indices).
- 2) Représentation du cycle d'amplification de la méthode illumina pour un read.

Sources : adapté de Illumina DNA Prep | Flexibility for many whole-genome sequencing applications, s. d & Nguyen, 2022

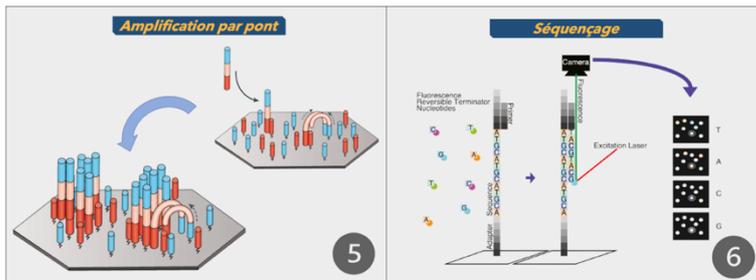


Figure 35 : Amplification par pont & lecture des « reads »

- 1) Amplification par pont de milliers de fragments
- 2) Lecture des nucléotides fluorescents après excitation par une source lumineuse (laser).

Sources : adapté de Goodwin *et al.*, 2016 ; Chaitankar, 2016

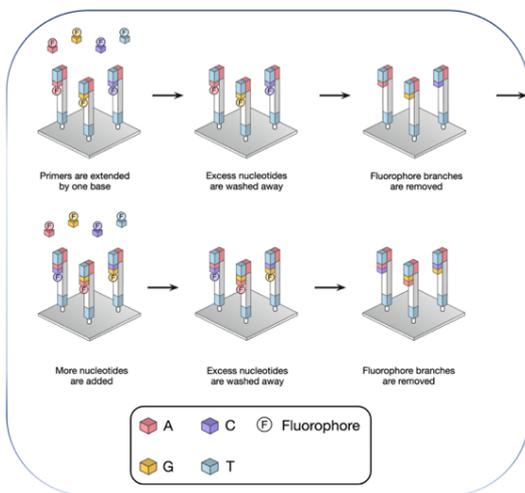


Figure 36 : Termineurs réversibles NGS Illumina

La méthode Illumina à recours à des nucléotides terminateurs réversibles par son approche de séquençage par synthèse, allongeant l'amorce de manière progressive, par l'ajout des terminateurs fluorescents 3'-O-azidométhyle. La plaque (ou flow cell) soumise à une imagerie et à un lavage des nucléotides non incorporés, permet d'obtenir une visualisation précise des motifs d'hybridation spécifiques. Le caractère réversible est possible par l'ajout de Tris(2-carboxyethyl)phosphine hydrochloride (TCEP), dont le rôle est de cliver la molécule fluorescente ainsi que le groupement 3'-O-azidométhyle, ce qui régénère le groupement 3'OH indispensable pour permettre une nouvelle liaison phosphodiester. Le cycle est répété jusqu'au séquençage du dernier nucléotide formant le read.

Référence : ATDBio – Next generation sequencing, s.d.

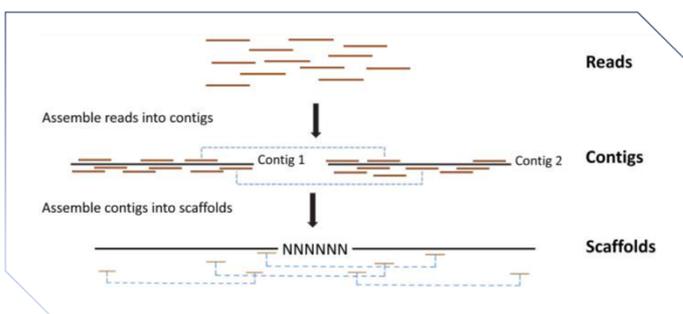


Figure 37 : Assemblage des « reads » selon la méthode Illumina

Les fragments séquencés forment des « reads » qui seront assemblés pour former des « contigs » eux-mêmes assemblés pour former des « scaffolds » utilisés afin de construire le génome entier.

Référence : Johnson *et al.*, 2012

1.10.8 Séquençage de nouvelle génération (NGS)

Dans ce chapitre, seule la méthode Illumina sera décrite, car elle est la méthode de NGS la plus couramment utilisée et utilisée lors de notre analyse, également appelée séquençage par synthèse (SBS).

La plaque de verre (ou « flow cell ») de la technique Illumina est constituée de plusieurs grilles, comprenant des milliers de cavités appelées "puits" ou "lanes", où ont lieu simultanément des milliers de réactions d'amplification. La préparation de la librairie consiste à fragmenter l'ADN de manière fortuite et d'y rajouter des adaptateurs à leurs extrémités. Cette étape est réalisée à l'aide d'un transposome, résultant de l'association entre une enzyme, la transposase (permet de cliver et ligaturer l'ADN) et d'un transposon (permet de se déplacer à travers le génome). Cette méthode de fragmentation est appelée **tagmentation** (cf figure 33). D'autres méthodes de fragmentation existent, telles que l'utilisation d'enzymes de restriction ou la sonication. Il résulte après la tagmentation, des fragments d'ADN de diverses tailles. Divers motifs sont ajoutés aux fragments, à savoir les adaptateurs schématisés sous P5 et P7 (A1 et A2 comme exemples pour l'illustration 4), les amorces sens et anti-sens (PS lect 1 et 2) ainsi que les indexs (courtes séquences d'ADN) qui sont comme des « codes-barres » permettant d'identifier chaque échantillon individuel dans un pool de séquençage multiplexé (cf figure 34).

L'amplification débute par le dépôt des fragments sur la plaque de verre (cf figure 34) (A) permettant l'hybridation entre l'adaptateur et l'oligos (A1 – OA) afin d'initier la réplication de l'ADN (B). S'en suit une étape de dénaturation et de lavage afin d'éliminer le brin matrice (C). Le fragment nouvellement synthétisé peut former un pont en s'hybridant avec le second adaptateur (A2 – OB) et l'amplification par pont peut débuter formant un double brin d'ADN (E). Ce double brin est dénaturé afin d'obtenir deux simples brins d'ADN qui à leur tour vont subir le même cycle. Dans la technologie Illumina, des milliers de fragments subissent l'amplification par pont (ou bridge amplification) simultanément, permettant un séquençage rapide à haut débit. A chaque incorporation d'un nucléotide fluorescent (chaque nucléotide étant marqué par un fluorophore différent) par la polymérase, la réaction de polymérisation est stoppée de manière réversible, le temps de capter le signal lumineux induit après excitation par une source lumineuse (laser dans cet exemple).

Ce signal est ensuite capturé par une caméra qui le transforme en signal numérique (traité par le logiciel informatique) afin de l'interpréter pour pouvoir déterminer la séquence nucléotidique (cf figure 35). Après un traitement chimique, le fluorochrome est clivé et le lavage permet de l'éliminer permettant au cycle suivant de débuter. Ces étapes se réalisent jusqu'au séquençage du dernier nucléotide (cf figure 36). Chaque fragment séquencé forme un « read », ceux-ci seront assemblés par un logiciel informatique (correspondant à un algorithme d'assemblage) et l'association de plusieurs « reads » forme un « contig ». L'assemblage de plusieurs « contigs » est ensuite réalisé, de manière à refléter l'ordre et l'orientation des fragments d'ADN dans le génome d'origine. L'association de plusieurs contigs forme un « scaffold », qui sont utilisés *in fine* à la construction du génome entier d'intérêt (cf figure 37).

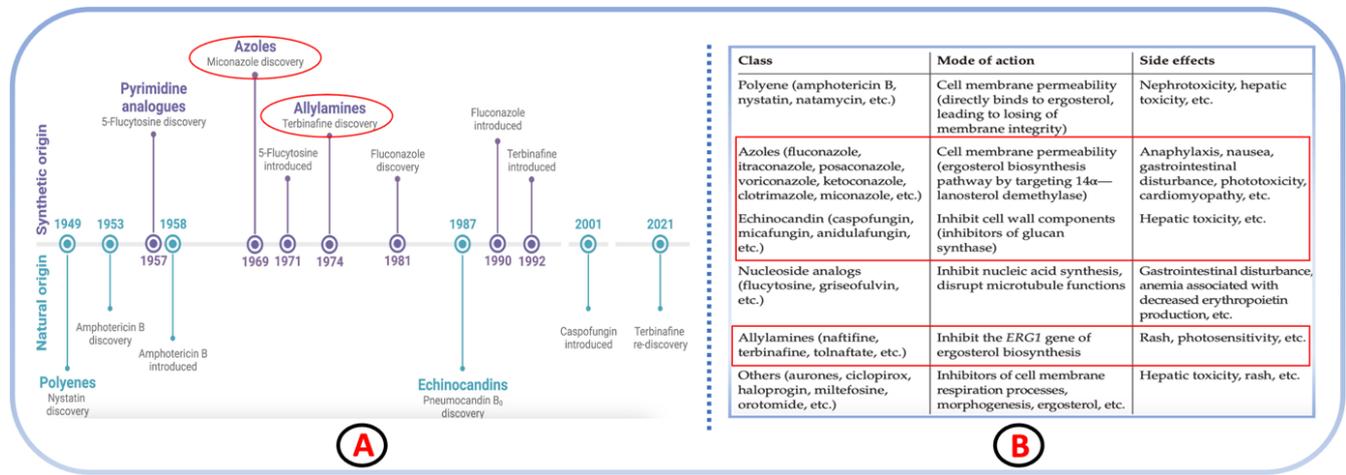


Figure 38 : Chronologie, classes et caractéristiques des médicaments antifongiques

A. Figure représentant la découverte des diverses classes d'antifongiques (non exhaustif), ainsi que leurs composés respectifs, séparés en fonction de leurs origines (naturelle ou synthétique). B. Le tableau suivant présente une sélection d'antifongiques appartenant à différentes classes (non exhaustif). Pour chaque classe d'antifongique, le mode d'action et les effets secondaires associés sont présentés.

Référence : Johnson *et al.*, 2012 ; Maurya *et al.*, 2020

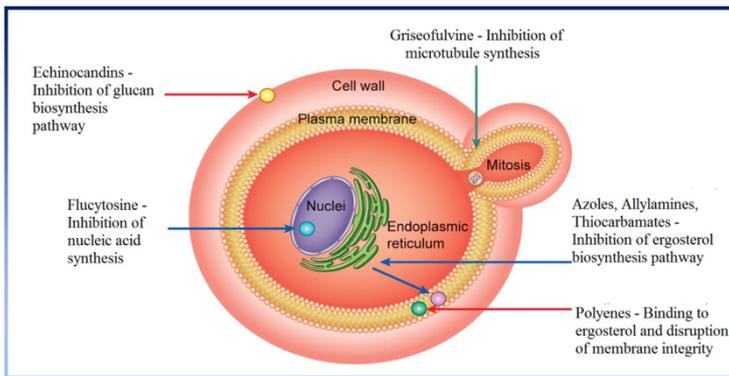


Figure 39 : Cible des différentes classes d'antifongiques traditionnels.

Référence : de Oliveira *et al.*, 2018

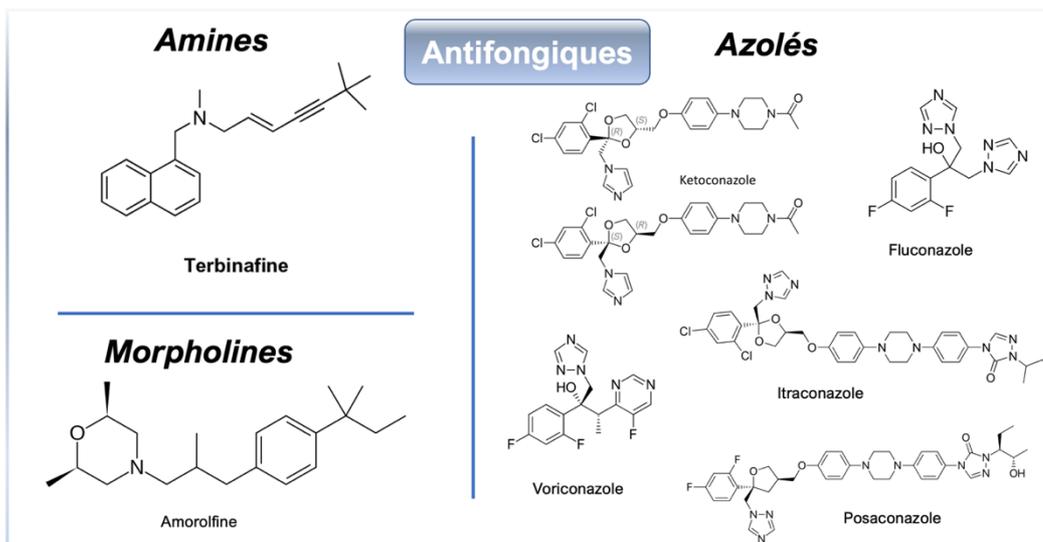


Figure 40 : Structure chimique de différentes classes d'antifongiques.

Référence : adapté de Ivanov *et al.*, 2022

La technique Illumina présente plusieurs avantages, en particulier sa capacité à séquencer simultanément des millions de fragments d'ADN en un seul run, ce qui la rend rapide, efficace et moins coûteuse (à grande échelle). De plus, elle se distingue par sa grande sensibilité, qui peut atteindre jusqu'à 1 %. Cependant, divers inconvénients lui sont attribués. En effet, puisque ces technologies génèrent des données importantes, il est nécessaire de disposer d'une infrastructure informatique et de stockage importante avec du personnel qualifié pour gérer et interpréter les résultats. La méthode Illumina est également chronophage, principalement en raison de l'analyse et de l'interprétation des données. Par ailleurs, en raison de la génération de courtes séquences, certains motifs sont difficilement caractérisés par la méthode NGS, notamment les régions riches en G-C, les éléments répétitifs ou encore les séquences contenant de multiples éléments homologues. De plus, la méthode Illumina, qui implique des réactions d'amplification, est associée à un certain degré de biais pouvant provoquer des erreurs de séquençage. Il convient de souligner que l'acquisition et la maintenance d'un équipement NGS peuvent constituer un frein pour certains laboratoires (77 ; 78 ; 79 ; 80).

1.11 Traitement des dermatophytoses

Après avoir identifié l'agent étiologique de la dermatophytose, il faut pouvoir administrer le traitement le plus efficace et le moins nuisible pour le patient. Le développement des antifongiques a pris du retard comparé aux antibiotiques. Cela peut s'expliquer par le fait que les bactéries sont des procaryotes alors que les champignons sont eucaryotes (cf figure 1). De ce fait, il est difficile de développer des antifongiques sélectifs et à faible effets secondaires pour l'humain (3). De nos jours, plusieurs classes d'antifongiques existent contre le traitement des dermatophytoses, en particulier les allylamines et les azolés.

Ces différents agents antifongiques possèdent un mode d'action différent ainsi que des effets secondaires et indications différents (cf figures 38 & 39 & 40). Un autre paramètre crucial à considérer est la voie d'administration de l'antifongique. En effet, l'administration systémique (par voie orale, intraveineuse, ...) d'un antifongique sera généralement plus efficace, mais peut entraîner des effets secondaires plus importants alors que l'administration topique (par voie cutanée, muqueuse, ...) sera généralement moins efficace, mais peut causer moins d'effets secondaires. De plus, il n'est pas rare de combiner différents antifongiques (systémiques et topiques) afin d'améliorer l'efficacité du traitement (81 ; 82).

1.11.1 Classe des allylamines

Les allylamines agissent en inhibant la voie de synthèse de l'ergostérol, un stérol retrouvé au sein de la membrane cellulaire, assurant l'intégrité membranaire. L'enzyme ciblée est la squalène epoxydase, intervenant en amont dans la voie de synthèse de l'ergostérol, qui est responsable de la conversion de la squalène en lanostérol. Cette inhibition provoque d'une part une accumulation intracellulaire de squalène qui est toxique et d'autre part une carence en ergostérol de la membrane entraînant une diminution de la stabilité membranaire qui résulte en une perte de l'intégrité membranaire et donc la mort du champignon (83 ; cf figures 3 & 41). La terbinafine (trb) est un membre de la classe des allylamines qui a été approuvé en tant qu'agent topique et ensuite oral respectivement en 1992 et 1996 (84 ; 85).

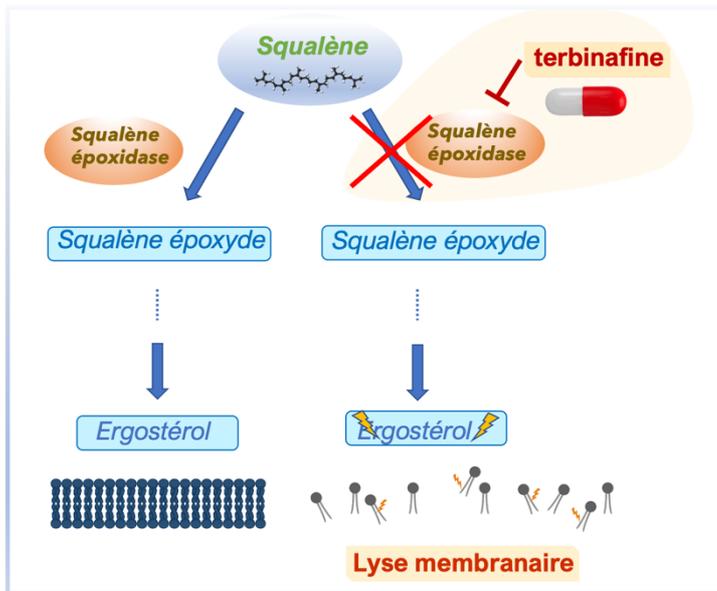


Figure 41 : Mode d'action de la terbinafine

Schéma résumé de la biosynthèse de l'ergostérol (stérol fongique) en une série d'étapes enzymatiques. La terbinafine agit en inhibant la squalène epoxydase, ce qui bloque la synthèse d'ergostérol, entraînant une perte de l'intégrité membranaire et une accumulation toxique de squalène, ce qui aboutit à la mort du champignon.

Référence : [figure personnelle](#)

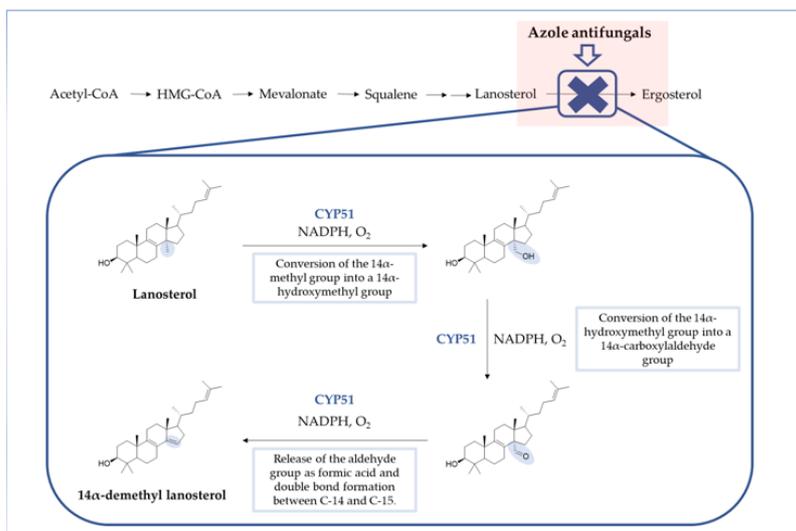


Figure 42 : Mode d'action des antifongiques de la classe des azolés

Schéma résumé de la biosynthèse de l'ergostérol (stérol fongique) en une série d'étapes enzymatiques. L'encadré rouge représente l'inhibition enzymatique des antifongiques azolés.

Référence : [Teixeira et al., 2022](#)

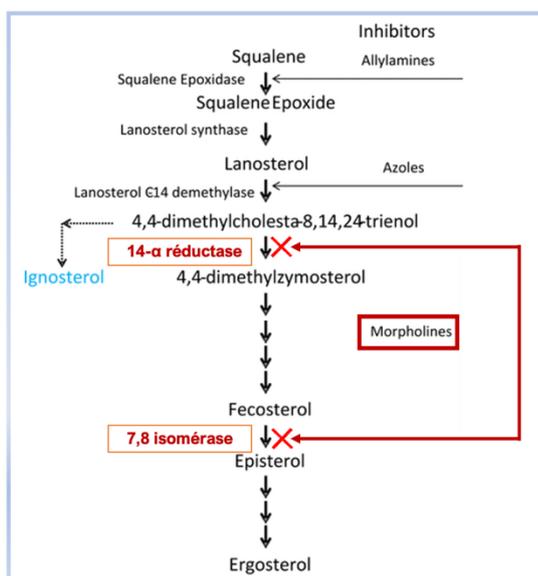


Figure 43 : Mode d'action de l'amorolfine

Sur la figure est représentée de manière simplifiée la voie de biosynthèse de l'ergostérol. L'amorolfine inhibe deux enzymes clés, perturbant la voie de synthèse de l'ergostérol entraînant la mort cellulaire (principalement par l'inhibition de la 14-α réductase).

Référence : adapté de [Jachack et al., 2015](#)

La terbinafine possède principalement une activité fongicide même si une activité fongistatique lui a été également attribuée chez certaines espèces de levures (86).

1.11.2 Classe des azolés

De nos jours, la classe des azolés représente les antifongiques qui sont majoritairement prescrits lors d'une infection fongique car ils possèdent un large spectre d'action et une bonne efficacité. Ils peuvent traiter tant les infections systémiques que topiques ou encore les onychomycoses. Ils agissent de la même façon que les allylamines, en inhibant la voie de synthèse de l'ergostérol, mais interviennent à une étape différente. Les azolés ciblent une enzyme appelée lanostérol 14 α -déméthylase (ou Cyp51), qui intervient également dans la voie de synthèse de l'ergostérol, par la conversion du lanostérol en 14-déméthyl lanostérol (cf figure 42). L'effet fongicide est par conséquent identique à la classe des allylamines (87).

La classe des azolés peut être divisée en deux grands groupes, à savoir les imidazoles (ex : miconazole et kétoconazole) et les triazoles (ex : fluconazole, itraconazole, voriconazole, posaconazole et isavuconazole). Les triazolés ont petit à petit remplacés les imidazoles car ils confèrent une toxicité moindre, un spectre d'action plus large, une meilleure solubilité et pharmacocinétique, une plus grande spécificité et affinité pour la Cyp51 fongique et par conséquent, une plus grande sélectivité et sécurité (88). Cependant, de nombreux inconvénients sont corrélés aux azolés, notamment l'acquisition rapide des résistances ou encore une certaine toxicité et interactions médicamenteuses par l'inhibition d'enzymes humaines telle que le cytochrome P450 impliqué dans la biosynthèse du cholestérol et le métabolisme de nombreux médicaments.

1.11.3 Amorolfine (classe des morpholines)

L'amorolfine est un antifongique topique de la classe des morpholines, introduit en 1981 (89) qui est principalement indiqué pour traiter les onychomycoses sous forme de vernis mais également prescrit sous forme de crème en Inde (90). L'amorolfine possède une activité fongicide et fongistatique (*in vitro*) avec un spectre d'activité assez large, agissant principalement contre les dermatophytes mais également contre certains champignons dimorphes ou encore certaines levures et moisissures.

L'amorolfine exerce son activité antifongique en interférant avec la voie de synthèse de l'ergostérol, en inhibant la 14- α réductase et la 7,8 isomérase toutes deux intervenant dans la biosynthèse de l'ergostérol (à des étapes différentes). Cette inhibition enzymatique perturbe la synthèse de l'ergostérol, ce qui conduit à une accumulation de stéroïdes toxiques et à une altération de la structure et de l'intégrité membranaire fongique, entraînant la mort du champignon (91 ; 92 ; cf figure 43).

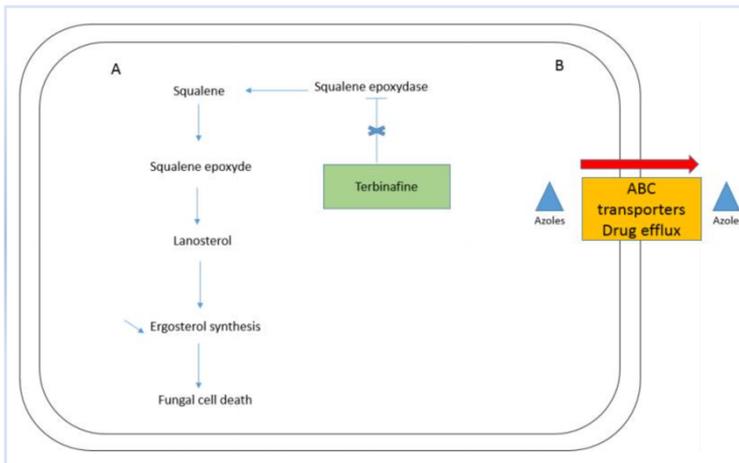


Figure 44 : mécanismes de résistance à la trb et azolés.

Figure illustrant la biosynthèse de l'ergostérol (A). En cas de mutation sur le gène de la SQLE, celle-ci a moins d'affinité pour la trb, rendant le champignon résistant. B) L'efflux des drogues par la superfamille ABC est principalement décrit pour la résistance aux azolés.

Référence : *Sacheli, Hayette, 2021*

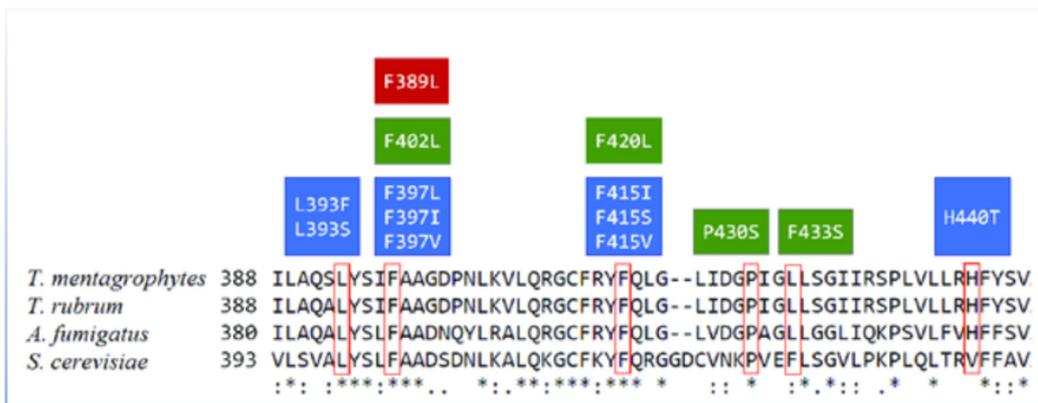


Figure 45 : différentes substitutions d'acides aminés dans le gène de la SQLE conférant une résistance des dermatophytes à la terbinafine.

Référence : *Martinez-Rossi et al., 2018*

Dermatophyte Species	Clinical Presentation	Alternative Therapy	Reference
<i>T.mentagrophytes</i>	Disseminated tinea corporis	Itraconazole 200 mg/day for 2–3 weeks + topical eberconazole	Hsieh et al., 2019 [17]
<i>T.mentagrophytes</i>	Tinea, corporis, tinea cruris	Itraconazole + ciclopirox	Burmester et al., 2019 [14]
<i>T. mentagrophytes VIII</i>	Extended tinea corporis	Topical miconazole and later ciclopirox	Suss et al., 2019 [25]
<i>T. mentagrophytes/interdigitale</i>	Extensive tinea corporis	Itraconazole 100 mg/day and topical luliconazole	Kimura et al., 2020 [35]
<i>T. interdigitale</i>	Extensive tinea corporis	Itraconazole 100 mg/day	Kakurai et al., 2020 [34]
<i>T. mentagrophytes VIII</i>	29 cases of tinea corporis	Recommended Itraconazole 200 mg/day for 4–8 weeks	Nenoff et al., 2020 [26]
<i>T. mentagrophytes VIII</i>	Extended tinea corporis from the groin	Voriconazole 200 mg/day	Fattahi et al., 2021 [38]
<i>T. mentagrophytes VIII</i>	Tinea pedis	2 successive itraconazole pulse therapy	Fattahi et al., 2021 [38]
<i>T. mentagrophytes VIII</i>	Extended tinea corporis from the groin	Itraconazole 100 mg/day for 4 weeks	Fattahi et al., 2021 [38]
<i>T. mentagrophytes VIII</i>	Extended tinea corporis from the groin	Voriconazole 200 mg/day	Fattahi et al., 2021 [38]

Figure 46 : Thérapies alternatives dans les cas de résistance à la trb.

Les alternatives peuvent reposer sur la combinaison de différents antifongiques ou encore sur l'augmentation de la dose et la durée traitement.

Référence : *Sacheli, Hayette, 2021*

1.12 Résistances aux antifongiques

Le traitement des onychomycoses reste difficile, est chronophage et est souvent sujet à des rechutes. C'est pourquoi il est souvent recommandé d'associer un traitement topique et systémique oral afin d'améliorer l'efficacité et le taux de guérison, prévenir d'une récurrence et diminuer la durée du traitement (93)

Les médicaments systémiques sont utilisés depuis des décennies (ex : griséofulvine, fluconazole, itraconazole). L'efficacité de l'antifongique repose sur plusieurs facteurs, tels que son affinité pour sa cible (p.ex la kératine), sa capacité à atteindre sa cible (p.ex la couche cornée ou une cible membranaire), ainsi que son adhérence pour exercer son action. Toutefois, l'évaluation de l'efficacité des antifongiques est complexe car les résultats *in vitro* ne sont pas toujours corrélés avec les résultats cliniques observés chez le patient. Par ailleurs, une émergence de dermatophytoses récalcitrantes (principalement *tinea cruris* et *corporis*), a été observée ces dernières années, principalement en Inde, par l'acquisition de mécanismes de résistances.

1.12.1 Mécanisme de résistance à la terbinafine

La résistance à la trb est principalement liée à diverses substitutions d'acides aminés (en particulier en position 393 et 397) au sein du gène codant pour la squalène epoxydase (SQLE) caractérisé pour la première fois chez *T. rubrum* en 2005 (94). Les mutations au sein du gène SQLE entraînent des altérations structurelles et une diminution de l'affinité de l'antifongique pour la SQLE (cf figure 44 & 45).

Une analyse globale de l'expression génique entre des souches mutées et des témoins n'a pas révélé d'autres différences significatives, suggérant que la mutation sur le gène SQLE serait probablement principalement responsable de la résistance à la trb (95). Depuis 2017, l'émergence de résistances à la trb a été rapportée, en Europe, Asie et particulièrement en Inde, principalement sur des isolats de *T. rubrum* et des espèces de la série *T. mentagrophytes*, caractérisées par diverses mutations au sein du gène de la SQLE (86 ; 96 ; cf figure 1.12.22).

Fort heureusement, des alternatives de traitement contre les dermatophytoses résistantes à la terbinafine existent, telles que l'utilisation d'azolés (pour un cas de *tinea corporis* étendu) comme l'itraconazole, couplé un traitement systémique et topique, augmenter la dose de trb ou encore l'utilisation d'allylamines couplées aux azolés (97 ; cf figure 46). De plus, une thérapie photodynamique a également été proposée en option dans le cas d'une résistance à la trb. Cette thérapie consiste à produire des espèces réactives de l'oxygène à l'aide d'un photosensibilisateur, de lumière et d'oxygène, qui agissent contre la croissance des multiples microorganismes y compris les dermatophytes (98).



Objectifs & stratégies expérimentales

2. Objectifs et stratégies expérimentales

2.1 Contexte de l'étude

Le centre national de référence pour les mycoses de Liège (CNRLM) a pour mission l'expertise et la surveillance épidémiologique et microbiologique des mycoses superficielles. Différentes études épidémiologiques ont été menées par le CNRLM afin d'évaluer la distribution des dermatophytes en Belgique (99 ; 100). Le niveau élevé de résistance à la terbinafine des isolats de dermatophytes indiens semble être à l'origine d'une épidémie de dermatophytoses en cours dans d'autres pays du monde (101 ; 102). C'est pourquoi, le CNRLM a initié une étude nationale belge (sujet du mémoire) débutant en avril 2022 jusqu'en avril 2023, portant sur la prévalence de dermatophytes résistants à la terbinafine. L'annonce a été faite par Sciensano, invitant tous les laboratoires belge à envoyer les souches de dermatophytes isolés à partir de prélèvements de peau en complétant une fiche renseignant sur les données du patients, ainsi que des informations épidémiologiques (cf annexe 1 ; annexe 2). La récente découverte de *T. indotineae*, la similarité génétique et morphologique, rendent la discrimination des espèces de la série *T. mentagrophytes* difficile (28). C'est pourquoi, il est urgent d'établir une mise au point d'outils / de techniques suffisamment discriminantes afin de pouvoir suivre l'évolution épidémiologiques des cas de résistances par *T. indotineae*, ce qui passe par un meilleur diagnostic au niveau du laboratoire.

2.2 Objectif de l'étude

L'étude menée poursuit plusieurs objectifs :

- I. **Déterminer** le **taux** de *T. indotineae* résistants à la **terbinafine** parmi les souches circulantes en **Belgique** entre avril 2022 et avril 2023. Ce taux est estimé par deux approches différentes :
 - **L'approche phénotypique** : en réalisant un screening par dilution en gélose suivi du test de confirmation par microdilution selon la méthode EUCAST E.DEF.11.0 permettant de définir la CMI.
 - L'approche **génotypique** : en réalisant un « Whole Genome Sequencing » (WGS) suivi d'une analyse bio-informatique (par le logiciel WGS Typer), comprenant notamment la recherche de mutations au sein du gène *SOLE*, la génération d'un dendrogramme de similarité et le ciblage de différents marqueurs moléculaires.
- II. Évaluer la distinction des espèces de la série *T. mentagrophytes* à partir d'un arbre phylogénétique construit à partir d'un séquençage moléculaire de la région *Ef1- α* et *ITS2* dans le but de :
 - Évaluer la distinction d'espèces entre *T. indotineae* et *T. mentagrophytes/interdigitale*, par la génération d'arbres phylogénétiques à partir d'un BLAST de la séquence *Ef1-alpha* et *ITS2* extraite des données obtenues par WGS.
 - Comparer le pouvoir discriminant entre le WGS et le séquençage Sanger en comparant les arbres phylogénétiques sur base du gène *Ef1- α* et *ITS2*.
 - Secondairement, déterminer à l'aide du logiciel RStudio, s'il existe une corrélation significative entre l'âge et le sexe et le fait d'être plutôt infecté par *T. mentagrophytes* ou *T. interdigitale*.

2.3 Stratégie expérimentale

La partie stratégie expérimentale peut être divisée en deux grandes catégories, à savoir, l'approche pratique et l'approche bio-informatique.

2.3.1 Approche pratique

L'approche pratique reprend toutes les manipulations qui ont été effectuées au laboratoire, elle peut être divisée en 5 grandes étapes. La première étape consiste en la réception, l'encodage et la mise en culture des dermatophytes. Le repiquage des souches sur gélose Sabouraud est réalisé afin d'établir le profil de résistance à la terbinafine. Ce profil est établi par un screening rapide sur plaque 12 puits ou **dermacheck** ensuite une confirmation est effectuée sur plaque 96 puits selon la méthode de référence EUCAST E.DEF.11.0 (103). Toutes les souches sont ensuite mises en culture sur milieu gélosé supplémenté en actidione suivie d'une culture en milieu liquide Sabouraud afin de réaliser l'extraction de l'ADN en vue du séquençage du gène Efl-alpha par la méthode Sanger. Les résultats obtenus seront ensuite comparés (par alignement) à un gène de référence Efl-alpha en vue de l'identification des espèces par la génération d'un arbre phylogénétique. Seules les espèces appartenant à la série *T. mentagrophytes* sont retenues dans cette analyse. Finalement, l'ADN est extrait à l'aide d'un kit spécifique pour la réalisation du séquençage à haut débit par Illumina NovaSeq6000.

2.3.2 Approche bio-informatique

L'approche bio-informatique comprend toutes les analyses bio-informatiques. La première étape consiste à télécharger les fichiers obtenus après séquençage (Sanger et Illumina) dans les serveurs de l'université (GenetiqueMED_SCBM & GIGA Genomics). Les fichiers FASTQ (comprenant notamment la séquence génomique ainsi qu'un score de qualité d'appel de bases) sont ensuite converti en fichier FASTA, correspondant à la reconstitution du génome via un assemblage *de novo* impliquant la perte d'informations sur la qualité d'appel de bases. Plusieurs analyses sont réalisées :

- Analyses portant sur le génome entier (phylogénomique) par la recherche de marqueurs (via l'utilisation de l'outil WGS Typer (voir point 3.10))
- La caractérisation génotypique des espèces par la création d'arbre phylogénétique par alignement d'un gène de référence Efl- α à partir des séquences obtenues par la méthode Illumina et Sanger. Ceci dans le but de comparer les arbres et valider la méthode Sanger comme outil discriminant en ce qui concerne les espèces de la série *T. mentagrophytes* (si les résultats entre les deux arbres sont identiques)
- Secondairement, le logiciel Rstudio sera finalement utilisé afin de vérifier une éventuelle corrélation entre l'agent étiologique et respectivement le sexe et l'âge des patients



Matériel et méthodes

3. Matériel et méthodes

3.1 Caractéristiques des souches

Dans le cadre de l'étude, 17 laboratoires basés en Belgique ont apporté leur contribution, mobilisant un total de 173 souches. La majorité de ces laboratoires se trouve en région Flamande, suivie de la Wallonie, tandis que Bruxelles est représentée en minorité (cf figure 47). En ce qui concerne les génomes de référence, il s'agit de génomes de dermatophytes déposés au sein de la base de données Genbank. A savoir, **MR816** pour *T. interdigitale* (ref GenBank: GCA_000622975.1), **D15P127** pour *T. mentagrophytes* (ref GenBank : GCA_003664465.1) et **TIMM20114** pour *T. indotineae* (ref GenBank: GCA_023065905.1)

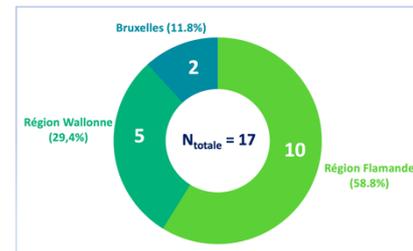


Figure 47 : classification des laboratoires participants en fonction des régions.

Les différentes souches analysées dans cette étude ont été isolées à partir de prélèvements de peau de sites anatomiques variés, comprenant notamment aine, jambe, pied, bras. Chaque souche possède une double identification, à savoir un numéro **GLIMS** et **ERT** (pour Étude Résistance Terbinafine). Le formulaire de demande ainsi que les laboratoires participants sont repris en annexes (cf Annexe 1 et 2).

3.2 Réception, encodage et stockage des échantillons

La liste du matériel utilisé est reprise dans le tableau ci-dessous :

Matériel	Usage	Référence
Tube SCAA	Milieu de culture	Biomérieux 42094
Gélose Sabouraud SGC2	Milieu de culture	Biomérieux 43651
Écouvillon stérile	Prélèvement / repiquage	Aptaca 5100/SG/2
Oese stérile	Prélèvement / repiquage	VWR 612-9356P
Incubateur / étuve	Croissance fongique	Memmert UNE 600
Tube cryogénique / lait	Conservation des souches/matériel	DELTALAB 409113/2 / Thermo Scientific 377224
Congélateur (-80°C)	Conservation des souches/matériel	Thermo Scientific Ultralow Freeze 907
Bec-Bunsen	Stérilisation du matériel / environnement	WLD-TEC GmbH Fuego SCS basic RF
Hotte à flux laminaire	Stérilisation de l'environnement	ESCO AC2-4S8-TU

Les échantillons sont reçus soit dans des tubes Sabouraud-chloramphénicol agar supplémentés d'actidione (SCAA) soit dans des géloses Sabouraud classiques. Les échantillons sont encodés, enregistrés et ensuite inoculés dans un tube SCAA afin d'obtenir une culture fraîche. L'inoculation est réalisée à l'aide d'un écouvillon et/ou d'une oese, en prélevant les dermatophytes du tube de prélèvement et en les étalant sur toute la surface du tube SCAA, qui sont ensuite mis à l'étuve pour une incubation entre 28-30°C durant 6-7 jours, ce qui permet la croissance et la sporulation des dermatophytes. Après une semaine, le maximum de culture est récupéré et transféré dans un tube cryogénique / de lait, à l'aide d'une oese et/ou écouvillon puis stocké au congélateur à -80°C pour une utilisation ultérieure. Les manipulations sont effectuées sous hotte à flux laminaire ou près du bec-bunsen, afin d'éviter une contamination de l'environnement. Si malgré tout, une contamination se produit, la manipulation est réitérée. Ce procédé de repiquage sur milieu Sabouraud-actidione permet une multiplication répétée de la culture des souches, offrant ainsi la possibilité de les utiliser de manière quasi-illimitée (cf figure 48).



Figure 48 : représentation simplifiée des manipulations effectuées lors de la réception et stockage des souches

3.3 Screening du profil de résistance à la terbinafine

La liste du matériel utilisé est reprise dans le tableau ci-dessous :

Matériel	Usage	Référence
Écouvillon stérile	Prélèvement / repiquage	Aptaca 5100/SG/2
Oese stérile	Prélèvement / repiquage	VWR 612-9356P
Incubateur / étuve	Croissance fongique	Memmert UNE 600
Bec-Bunsen	Stérilisation du matériel / environnement	WLD-TEC GmbH Fuego SCS basic RF
Hotte à flux laminaire	Stérilisation de l'environnement	ESCO AC2-4S8-TU
Tube cryogénique / lait	Conservation des souches/matériel	DELTALAB 409113/2 / Thermo Scientific 377224
Congélateur (-80°C)	Conservation des souches/matériel	Thermo Scientific Ultralow Freeze 907
Pipette pasteur	Transfert de liquides en tous genres	Copan 201CS01
Gélose SGC2	Milieu de culture	Biomérieux 43651

L'ensemencement des souches se réalise à partir des tubes cryogéniques / lait conservés à -80°C au congélateur et consiste à déposer 1 à 2 gouttes de suspension fongique à l'aide d'une pipette pasteur sur un milieu Sabouraud gentamicine chloramphénicol agar (SGC2). La suspension est étalée en réalisant des stries sur toute la surface de la gélose via une oese/écouvillon. Les manipulations sont effectuées en milieu stérile, soit par l'utilisation d'un bec-bunsen soit sous hotte à flux laminaire. Les géloses sont ensuite mises à l'étuve à 28-30°C durant un maximum de 6-7 jours, afin de permettre la croissance et la sporulation des dermatophytes. Après une semaine, les géloses sont récupérées. Finalement, les géloses sont soumises au dermacheck, méthode qui fut l'objet d'une mise au point lors d'un mémoire précédent par M. Gouters (104), suivi de la confirmation par la méthode EUCAST E.DEF 11.0 afin de confirmer les souches résistantes et sensibles à la terbinafine (cf figure 49). Le dermacheck est une méthode home-made, adaptée de la méthode TCAM, mise au point en analogie au VIP check pour les aspergillus (permettant la détection de résistances aux azolés),

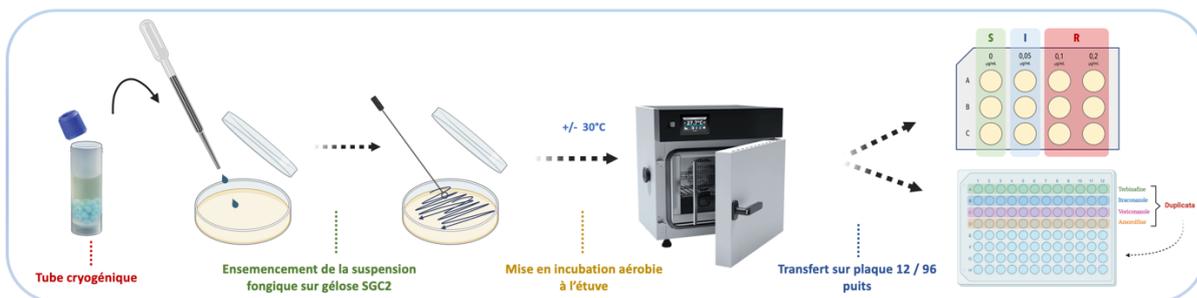


Figure 49 : représentation simplifiée des manipulations effectuées lors de l'ensemencement des dermatophytes sur gélose SGC2 afin de réaliser le screening de résistance à la terbinafine suivi de la confirmation par la méthode EUCAST E.DEF 11.0.

3.4 Screening sur plaque 12 puits (dermacheck)

Matériel	Usage	Référence
Écouvillon stérile	Prélèvement / repiquage	Aptaca 5100/SG/2
Oese stérile	Prélèvement / repiquage	VWR 612-9356P
Incubateur / étuve	Croissance fongique	Memmert UNE 600
Bec-Bunsen	Stérilisation du matériel / environnement	WLD-TEC GmbH Fuego SCS basic RF
Hotte à flux laminaire	Stérilisation de l'environnement	ESCO AC2-4S8-TU
Tube cryogénique / lait	Conservation des souches/matériel	DELTALAB 409113/2 / Thermo Scientific 377224
Congélateur (-80°C)	Conservation des souches/matériel	Thermo Scientific Ultralow Freeze 907
Pipette pasteur stérile	Transfert de liquides en tous genres	Copan 201CS01
Gélose SGC2	Milieu de culture	Biomérieux 43651
Erlenmeyer 2L	Préparation de milieux en tous genres	Schott Duran
Barreau magnétique	Homogénéisation de liquides	/
Eau stérile	Diluant	Braun 20x10ml BE119201
Sabouraud dextrose broth	Préparation de milieu Sabouraud	Sigma-Aldrich S3306 500g
Agar-agar	Polymère gélifiant	BD 214530
Spatule	Prélèvements de substances solides	/
Cupule plastique	Support de pesée	VWR 611-9164
Titre 1 Balance	Pesée de multiples substances	Mettler-Toledo PC2200 DR
Agitateur magnétique chauffant	Homogénéisation et chauffe	LMR AG602
Erlenmeyer 1L	Préparation de milieux en tous genres	Schott Duran
Ouate	Recouvrir/isoler du matériel	/
Papier aluminium	Recouvrir/isoler du matériel	Reynolds Aluminium A18593
DMSO	Dilution des drogues (solvant)	Merck S3306
Autoclave	Stérilisation	Tuttanauer 3850el
Hydrochloride de terbinafine	Antifongique	Sigma Aldrich T8826-250MG
Microtube stérile 1,5 mL	Diverses utilisations (stockage, préparation de solutions / échantillons, ...)	Sarstedt 72.692.005
Micropipette 2 µL		RAININ Pipet-Lite LTS 0.1 – 2 µL
Micropipette 10 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 0.5 – 10 µL
Micropipette 20 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 2 – 20 µL
Micropipette 100 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 10 – 100 µL
Micropipette 200 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 20 – 200 µL
Micropipette 1000 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 100 – 1000 µL
Tube en plastique	Préparation de la suspension fongique	
Plaque 12 puits	Screening de résistance	Thermo Scientific 130185
Vortex	Mélanger / homogénéiser	IKA Vortex 2 S000
Denscheck / Densitomètre	Lecture de la densité optique	Biomérieux 21255
Pipette automatique	Prélèvements divers	RAININ Pipet-Lite Multi Pipette L8-200XLS+
Eau désionisée	Diluer suspension fongique	/

La liste du matériel utilisé est reprise dans le tableau ci-dessous :

Le milieu Sabouraud-agar est préparé dans un Erlenmeyer de 2000 mL où a été introduit un barreau magnétique, dans lequel est versé un litre d'eau milliQ. Ensuite, 30g de Sabouraud dextrose ainsi que 15g d'agar-agar sont pesés (séparément) à l'aide d'une balance en utilisant une spatule métallique et une cupule en plastique et sont introduits dans l'Erlenmeyer.

L'Erlenmeyer est posé sur un agitateur magnétique chauffant, permettant

l'homogénéisation de la solution qui est laissée sous agitation et légèrement chauffée durant 10 minutes. Finalement, la solution d'un litre est divisée à la main dans 3 autres erlenmeyer (capacité 1L) chacun rempli à 250 mL où est également ajouté un barreau magnétique. Le goulot des 4 erlenmeyers est recouvert d'ouate puis d'une couche de papier aluminium, et les erlenmeyers sont annotés avec un feutre indélébile : 0 – 0,2 – 0,05 et 0,1 et ensuite mis à autoclaver à 121°C (cf figure 50).

La solution stock de terbinafine 3200 µg/ml est préparée dans un erlenmeyer contenant 5ml de diméthylsulfoxyde (DMSO) où est ajouté un barreau magnétique, en pesant 16,32 mg de trb à l'aide d'une balance analytique avec une spatule métallique dans une cupule en plastique. La quantité pesée est calculée selon la formule suivante :

- $Weight (g) = volume (L) \times Conc (mg/L) / potency (mg/g)$
- $Weight(g) = 0,005 \times (3200/980) = 0,0163g \rightarrow 16,32mg$

La poudre de trb se dissout dans la solution après mise sous agitation, sans chauffer durant 10min. L'Erlenmeyer est couvert d'ouate et d'une couche de papier aluminium et mis à autoclaver à 121°C. Finalement, 1 mL de la solution de 5mL est transférée dans des 5 tubes de 2mL et les tubes sont conservés à -80°C.

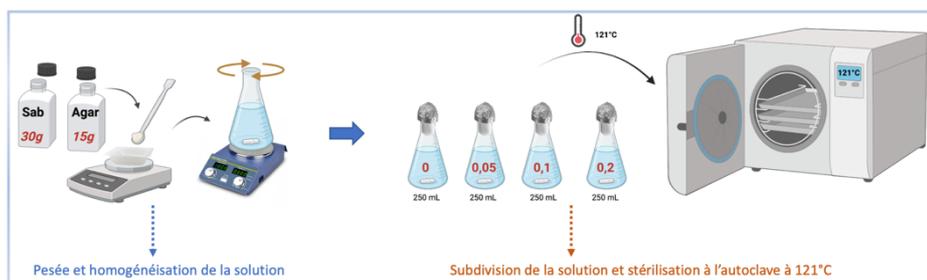


Figure 50 : Préparation du milieu sabouraud-agar-actidione.

Une solution de Sabouraud et d'agar a été préparée en mélangeant 30g de Sabouraud et 15g d'agar dans 1L d'eau MilliQ. La solution est ensuite divisée en 4x250mL dans 4 erlenmeyer d'un litre. Le tout est stérilisé à l'autoclave à 121°C.

Après autoclavage et une fois la température de 50°C atteinte, différents volumes de terbinafine sont ajoutés dans les erlenmeyers. Lors de l'ajout de trb, les erlenmeyer sont mis sous agitateur magnétique chauffant durant 2 minutes. Au départ de la solution stock de trb à 3200 µg/ml est ajouté dans l'erlenmeyer via une pipette de 20 et de 10 à :

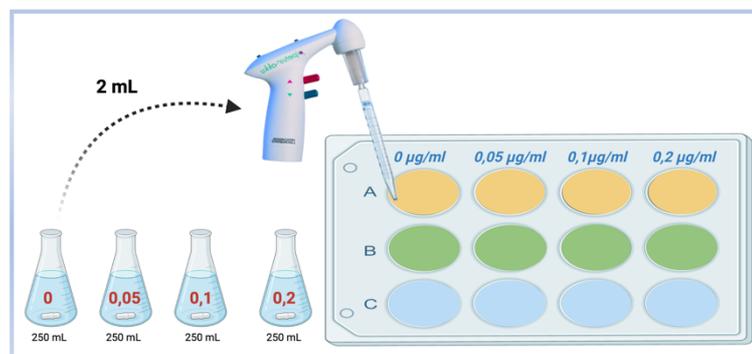


Figure 51 : Préparation des plaques 12 Puits

Deux millilitres de chaque concentration respective sont versés dans la colonne correspondante à l'aide d'une pipette automatique.

- **0,2 mg/l** : 15,6 µl de la solution stock de terbinafine (dilution 16000x)
- **0,1 mg/l** : 7,8 µl de la solution stock de terbinafine (dilution 32000x)
-
- **0,05 mg/l** : 3,9 µl de la solution stock de terbinafine (dilution 64000x)
- **0 mg/l** : 0 µl de la solution stock de terbinafine → sert de contrôle positif de croissance

Finalement, la plaque étant constituée de 3 lignes et de 4 colonnes, où chaque colonne correspond à une concentration spécifique d'un Erlenmeyer, 2 mL de solution est versée à l'aide d'une pipette automatique dans chaque colonne à la concentration correspondante de 0 - 0,05 - 0,1 et 0,2 (cf figure 51). Les plaques sont ensuite annotées et conservées durant 3 mois au frigo à 4°C, où le délais de conservation a été validé lors de la mise au point des plaques (104).

Une fois les dermatophytes multipliés sur gélose, une quantité suffisante de dermatophytes est prélevée via un écouvillon et transféré dans un tube en plastique contenant de l'eau déminéralisée afin d'obtenir une suspension fongique à une densité optique de 0,5 MacFarland / McF (+/- 5 allant de 0,45 à 0,55 McF), lue avec un densicheck (densitomètre). Une fois la valeur de 0,5 McF obtenue, 100 µL de la suspension fongique est versée dans chaque puit d'une même ligne de la plaque 12 puits à l'aide d'une micropipette (cf figure 52). L'analyse

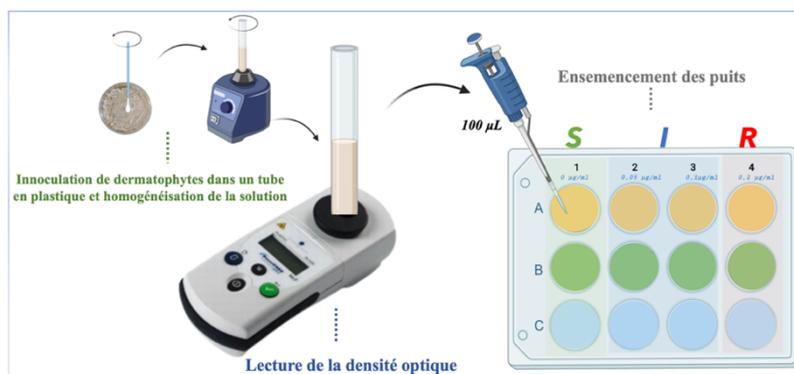


Figure 52 : Ensemencement des plaques 12 puits

Les champignons sont inoculés dans un tube en plastique, homogénéisé et une fois la densité fongique souhaitée obtenue, la suspension est ensemencée dans une même ligne de la plaque 12 puits. La lecture de la plaque est réalisée 5-8 jours après la mise à l'étuve.

(visuelle) de la plaque est effectuée après 5-8 jours, incubée entre 28-30°C. L'European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) préconise de considérer une valeur ECOFF (Epidemiological Cut-Off Value) pour la trb à 0,125 µg/ mL en ce qui concerne les espèces de la série *T. mentagrophytes*. L'ECOFF correspond à la concentration minimale d'un antifongique nécessaire pour inhiber la croissance d'une population fongique sauvage dans une population donnée, afin de déterminer si la souche d'intérêt est sensible ou résistante à l'antifongique. Cette valeur est espèce-dépendante, et peut varier d'une espèce à une autre (105). Une souche sera considérée comme résistante si une croissance

est observée (dans chaque puit) au-delà du 3^{ème} puit. A l'inverse, une souche est considérée comme sensible si la croissance ne s'étend pas au-delà du 2^{ème} puit. Le résultat sera rejeté si :

- Aucune croissance n'est observée au 1^{er} puit de contrôle positif
- Une contamination est visible dans un puit.
- Un saut de croissance apparaît, c'est-à-dire, qu'un puit vide (aucune croissance) précède un puit où une croissance a eu lieu.

Bien que la technique soit simple et rapide, cette méthode peut présenter un souci de spécificité, ce qui entraîne inévitablement la production de résultats faussement positifs (104). De plus, par cette méthode, la concentration minimale inhibitrice n'est pas déterminée précisément. C'est pourquoi la méthode de microdilution EUCAST E.DEF 11.0 est également réalisée, certes plus laborieuse mais compense le manque de spécificité de la méthode dermacheck et permet de déterminer l'ECOFF de façon plus précise.

3.5 Méthode de confirmation par microdilution EUCAST E.Def. 11.0

La liste du matériel utilisé est reprise dans le tableau ci-dessous :

Matériel	Usage	Référence
Écouvillon stérile	Prélèvement / repiquage	Aptaca 5100/SG/2
Oese stérile	Prélèvement / repiquage	VWR 612-9356P
Incubateur / étuve	Croissance fongique	Memmert UNE 600
Bec-Bunsen	Stérilisation du matériel / environnement	WLD-TEC GmbH Fuego SCS basic RF
Hotte à flux laminaire	Stérilisation de l'environnement	ESCO AC2-4SR-TU
Tube cryogénique / lait	Conservation des souches/matériel	DELTALAB 409113/2 / Thermo Scientific 377224
Congélateur (-80°C)	Conservation des souches/matériel	Thermo Scientific Ultralow Freeze 907
Pipette pasteur	Transfert de liquides en tous genres	Copan 201CS01
Gélose SGC2	Milieu de culture	Biomérieux 43651
Erlenmeyer 2L	Préparation de milieux en tous genres	Schott Duran
Barreau magnétique	Homogénéisation de liquides	/
Eau déionisée	Diluant	/
Sabouraud dextrose broth	Préparation de milieu Sabouraud	Sigma-Aldrich S3306 500g
Agar-agar	Polymère gélifiant	BD 214530
Spatule	Prélèvements de substances solides	/
Cupule plastique	Support de pesée	VWR 611-9164
Balance	Pesée de multiples substances	Mettler-Toledo PC2200 DR
Agitateur magnétique chauffant	Homogénéisation et chauffe	LMR AG602
Erlenmeyer 1L	Préparation de milieux en tous genres	Schott Duran
Ouate	Recouvrir/isoler du matériel	/
Papier aluminium	Recouvrir/isoler du matériel	Reynolds Aluminium A18593
DMSO	Dilution des drogues (solvant)	Merck S3306
Autoclave	Stérilisation	Tuttnauer 3850el
Hydrochloride de terbinafine	Antifongique	Sigma Aldrich T8826-250MG
Microtubes stériles 1,5 mL	Diverses utilités (stockage, préparation de solutions / échantillons, ...)	Sarstedt 72.692.005
Micropipette 2 µL		RAININ Pipet-Lite LTS 0.1 – 2 µL
Micropipette 10 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 0.5 – 10 µL
Micropipette 20 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 2 – 20 µL
Micropipette 100 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 10 – 100 µL
Micropipette 200 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 20 – 200 µL
Micropipette 1000 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 100 – 1000 µL
Tube en plastique	Préparation de la suspension fongique	Sarstedt 55.476.005
Plaque 96 puits	Screening de résistance	Costar 3628
Vortex	Mélanger / homogénéiser	IKA Vortex 2 S000
Denscheck / Densitomètre	Lecture de la densité optique	Biomérieux 21255
Pipette automatique	Prélèvements divers	DLAB Scientific Levo Plus Pipette Filler
Pipette sérologique	Aspiration/Distribution de solutions	Falcon 357530
RPMI 2%	Milieu de culture	Xebios Diagnostics R504.76.0250
Balance analytique	Pesée antifongiques	Sartorius Lab MSA225P-1CE-DI
Voriconazole	Antifongique	Sigma Aldrich PZ0005-25MG
Itraconazole	Antifongique	Sigma Aldrich I6657-100MG
Hydrochlorure d' amorolfine	Antifongique	Sigma Aldrich SML0283-50MG
Cycloheximide	Antibiotique	Sigma Aldrich c4859-1ml
Tête d'inoculation	Inoculation sensitiitre	ThermoScientific E3010
Automate Sensitiitre	Inoculation automatisée sensitiitre	ThermoScientific V3020
Lecteur de plaque	Lecture spectrophotométrique des plaques 96 puits	ThermoScientific 51119000
Filtre de porosité	Filtration de la suspension fongique	Merck Millipore NY1102500
Seringue	Prélèvement milieu de culture	Emerald 303219
Filtre nylon	Filtration de la suspension fongique	Merck Millipore NY1102500
Multipipette	Prélèvement des drogues pour la préparation des plaques de screening	RAININ Pipet-Lite Multi Pipette L8-200XLS+
Balance analytique	Pesée	Sartorius Lab MSA225P-1CE-DI
Tube de verre	Préparation de milieu	DURAN 261311102
Eau déminéralisée	Préparation de milieu liquide	ThermoScientific T3339
Tween 0,1%	Préparation de milieu liquide	Sigma-Aldrich P9416-100ML
Centrifugeuse	Centrifugation	Eppendorf 5425

L'antifungigramme, selon la méthode standardisée EUCAST E.DEF 11.0, est réalisé par microdilution automatisée sur plaques 96 puits. Cette méthode utilise quatre antifongiques : la terbinafine (trb), l'itraconazole, le voriconazole et l'amorolfine, comme décrite par l'équipe d'Arendrup (103).

L'élaboration des plaques commence par la préparation d'un stock d'antifongiques (identique pour chaque antifongique), conformément au point 3.2.3. Ensuite, onze dilutions de chaque drogue sont préparées sous hotte à flux laminaire, en utilisant onze microtubes stériles (+ un microtube de contrôle de croissance représenté par le 12^{ème} microtube) pour chaque antifongique (annotés de 1 à 11), selon le schéma illustré dans la figure 53. Pour cela, une micropipette de 100 (volumes 50-100 µL) et 1000 (volumes 150-350 µL) sont utilisées.

Pour chaque antifongique, un bac compartimentalisé en 12 colonnes préalablement autoclavé est préparé, où 9,9 mL de milieu de culture RPMI (Roswell Park Memorial Institute) sont ajoutés dans les 11 premières colonnes, tandis que 10 mL de milieu RPMI sont ajoutés dans le dernier compartiment servant de contrôle positif de croissance.

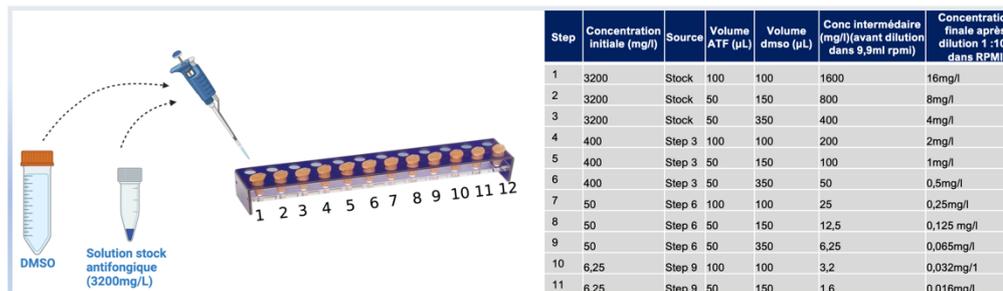


Figure 53 : Préparation des dilutions d'antifongiques
Chaque antifongique (4) est dilué dans du DMSO dans 11 microtubes stériles différents.

Ensuite, 100 µL de chaque concentration en antifongique est versé (pipette 100) dans les compartiments respectifs du bac (à l'exception du contrôle positif de croissance), en commençant par la concentration la plus élevée (un bac pour chaque antifongique). Enfin, la solution est homogénéisée en agitant délicatement le bac et 100 µL de chaque dilution est transféré avec une multipipette dans une rangée spécifique (soit 12 puits) de la plaque 96 puits, en ordre croissant de concentration, de la droite vers la gauche. L'opération est réalisée en duplicata (cf figure 54)

Chaque nouveau lot de plaques est testé à l'avance avec une souche de contrôle de qualité (IHEM) aux valeurs définies par l'EUCAST avant de réaliser l'antifungigramme et sont stockées au congélateur à -80°C. Afin d'initier cet examen, une plaque ainsi qu'une souche sont retirées du congélateur. Toutes les manipulations (à l'exception de l'inoculation automatisée) sont effectuées sous hotte à flux laminaire et le matériel utilisé est préalablement stérilisé à l'autoclave (121°C) ou chauffé au bec-bunsen avant utilisation afin d'éviter toute contamination. Une suspension fongique est obtenue en versant un mélange eau-tween (0,1%) dans la culture fongique et en frottant avec un écouvillon. Le transfert de la solution est effectué par une seringue introduite dans un système de filtre de porosité 11µm ajouté à l'aide d'une pince. Le tube est vortexé et mesuré à l'aide d'un densitomètre dont la valeur cible est 0,50 McF (+/- 5McF). Si la densité optique de la suspension est inférieure à 0,45 McF, l'opération est réitérée. Si la densité est supérieure à 0,55 McF, la suspension est diluée avec le mélange eau-tween (0,1%) à l'aide d'une pipette pasteur. Enfin, 500 µL de cette suspension

fongique est introduite dans deux tubes d'inoculation contenant de l'eau déminéralisée stérile dans lequel a été ajouté au préalable 11 µL de chloramphénicol (50mg/mL) ainsi que 33 µL de cycloheximide (100 mg/mL), afin de diminuer le risque de contamination. Les tubes d'inoculations sont ensuite placés sur l'automate (après avoir ajouté la tête d'inoculation) qui

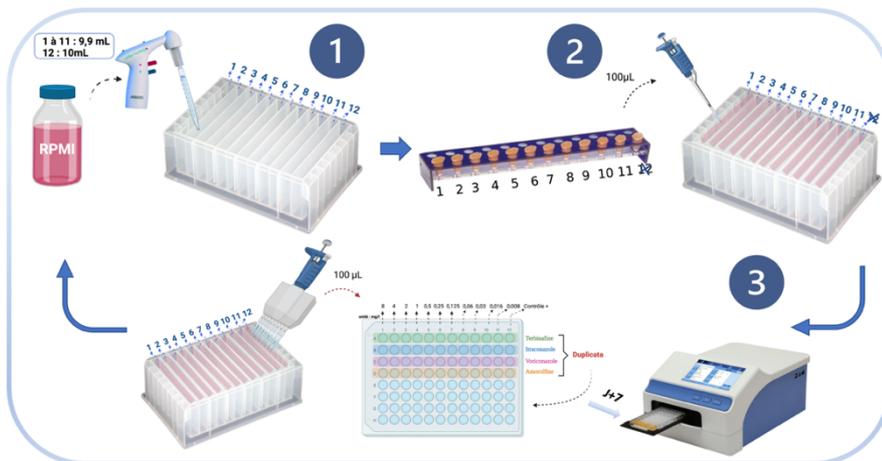


Figure 54 : Préparation des plaques de microdilution EUCAST E.DEF.11.0

(1) Un volume défini de milieu RPMI est ajouté à la pipette automatique dans chaque compartiment des 4 bacs (2) dans lequel est également ajouté 100 µL d'antifongique dans un compartiment défini (dilution 1 dans le compartiment 1 et ainsi de suite). (3) Après homogénéisation (par agitement), 100 µL de milieu (RPMI+dilution antifongique) est transféré en duplicata à la multipipette dans chaque ligne respective.

inocule chaque puit avec 100 μL de la suspension fongique (cf figure 55). Les plaques sont ensuite incubées à température ambiante durant 7j et sont lues à l'aide d'un lecteur spectrophotométrique à 492nm.

Les résultats sont générés sous forme d'une table d'absorbance brute, à laquelle il faut soustraire l'absorbance intrinsèque du milieu (RPMI, chloramphénicol, cycloheximide) de l'entièreté de la plaque, en réalisant un blanc analytique, dont la valeur moyenne est de 0,0838 ce qui permet d'obtenir une table d'absorbance corrigée, représentée sous forme d'un nuage de points. L'analyse du graphique consiste à déterminer les valeurs de cut-off (CMI_{50} et CMI_{10}). La CMI_{50} correspond à la concentration minimale d'un antifongique

(dans ce cas) nécessaire pour inhiber la croissance de 50% des champignons testés (et/ou de réduire l'absorbance de moitié). Visuellement, cela se traduit par le 1^{er} point se situant en dessous des traits verts (cf figure 56). Si la CMI_{50} dépasse l'ECOFF préconisé par l'EUCAST, la souche est considérée comme résistante (cf figure 57).

La CMI_{10} est défini comme la concentration minimale nécessaire pour inhiber la croissance de 90% des champignons testés (et/ou de réduire l'absorbance de 90%). Visuellement, cela se traduit par le 1^{er} point se situant en dessous des traits rouges (cf figure 56).

L'ECOFF (Epidemiological Cut-Off Value) est une valeur seuil utilisée dans le domaine de la microbiologie pour déterminer la

sensibilité intrinsèque d'une population d'agents pathogènes à un antibiotique/antifongique spécifique. Les souches ayant une valeur de sensibilité égale ou inférieure à l'ECOFF sont considérées comme potentiellement sensibles. Les valeurs ECOFF sont basées sur des études microbiologiques et n'indiquent pas nécessairement si un médicament sera cliniquement actif, car elles ne tiennent pas compte de l'activité de l'antifongique *in vivo* contrairement aux valeurs de « breakpoint ». L'ECOFF est défini comme la valeur CMI la plus élevée des isolats qui ne sont pas connus pour avoir une résistance et sont donc considérés comme représentatifs des isolats de type sauvage. En l'absence de « breakpoints » définis pour les dermatophytes, le recours à la valeur ECOFF est nécessaire..

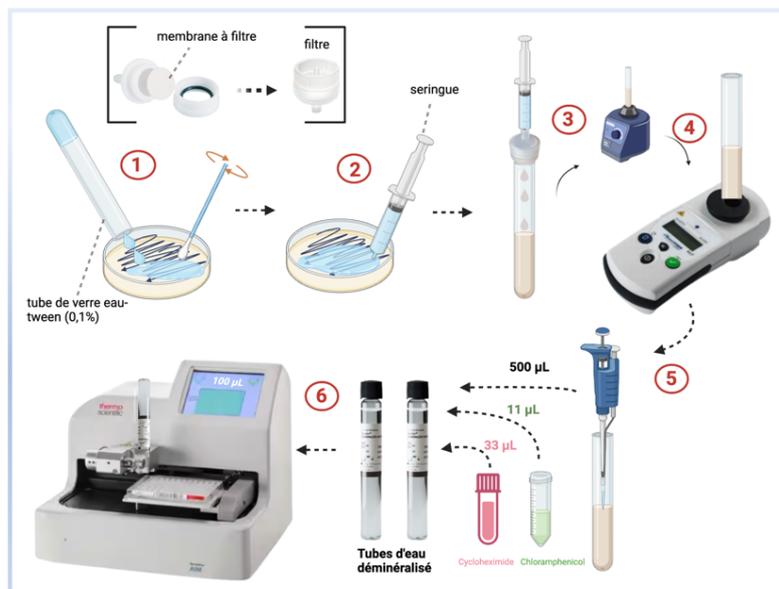


Figure 55 : Inoculation plaques de microdilution EUCAST E.DEF.11.0

L'inoculation des plaques de microdilution EUCAST E.DEF.11.0 est réalisée par l'ajout d'un mélange eau-tween et une suspension fongique est obtenue en frottant la culture avec un écouvillon (1). La solution est récupérée à l'aide d'une seringue passée au travers d'un système de filtre de porosité (3) pour en lire la densité optique (4) qui doit se situer à 0,5 McF (+/- 5). Par la suite, 500 μL de la suspension fongique sont transférés dans deux tubes d'inoculation contenant préalablement du cycloheximide et du chloramphénicol (5). L'inoculation des tubes sur la plaque est effectuée automatiquement (6) et les plaques sont lues après 7j d'incubation.

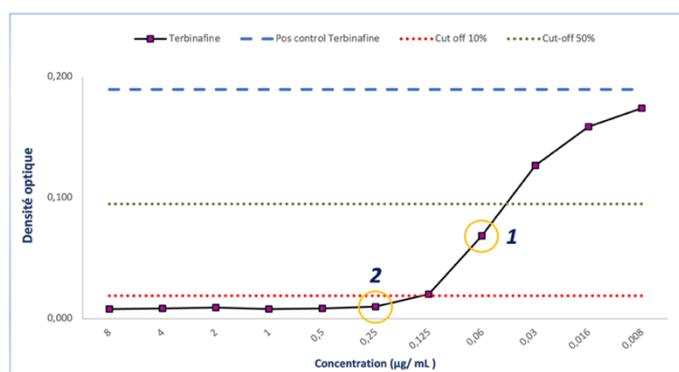


Figure 56 : Lecture de la plaque de microdilution .

La plaque 96 puits est lue par un spectrophotomètre, à une absorbance de 492 nm et après correction, génère une table d'absorbance corrigée. La CMI_{50} dans ce cas est de 0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (1) et la CMI_{10} est de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (2). La souche est par conséquent considérée comme sensible concernant la trb.

Antifongique	ECOFF ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
Amorolfine	0,5
Itraconazole	0,25
Terbinafine	0,125
Voriconazole	1

Figure 57 : Tableau des ECOFF définis par l'EUCAST pour l'espèce *T. indotineae*
Référence : EUCAST, 2022

3.6 Séquençage Sanger Ef1-alpha

La liste du matériel utilisé est reprise dans le tableau ci-dessous :

Matériel	Usage	Référence
Écouvillon stérile	Prélèvement / repiquage	Aptaca 5100/SG/2
Oese stérile	Prélèvement / repiquage	VWR 612-9356P
Incubateur / étuve	Croissance fongique	Memmert UNE 600
Bec-Bunsen	Stérilisation du matériel / environnement	WLD-TEC GmbH Fuego SCS basic RF
Hotte à flux laminaire	Stérilisation de l'environnement	ESCO AC2-4S8-TU
Tube cryogénique / lait	Conservation des souches/matériel	DELTALAB 409113/2 / Thermo Scientific 377224
Congélateur (-80°C)	Conservation des souches/matériel	Eppendorf Cryocube F740h
Pipette pasteur	Transfert de liquides en tous genres	Copan 201CS01
Tube SCAA	Milieu de culture	Biomérieux 42094
QIAamp® DNA Mini Kit (250)	Extraction d'ADN	Qiagen 51306
Micropipette 2 µL		RAININ Pipet-Lite LTS 0.1 – 2 µL
Micropipette 10 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 0.5 – 10 µL
Micropipette 20 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 2 – 20 µL
Micropipette 100 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 10 – 100 µL
Micropipette 200 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 20 – 200 µL
Micropipette 1000 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 100 – 1000 µL
Tampon 1x PCR	Préparation mix PCR	Thermo Fisher N8080010
MgCL2	Préparation mix PCR	Thermo Fisher N8080010
dNTPs	Préparation mix PCR	Thermo Fisher G501802
TaqMan Polymérase	Préparation mix PCR	Applied Biosystems N8080156
Thermocycleur (PCR)	Amplification génomique	Thermo Scientific 4375305
Gel polyacrylamide 2% adn	Observation de la qualité d'extraction	Thermo Fisher Scientific G501802
Appareil d'électrophorèse	Migration électrophorétique du gel	Thermo Fisher Scientific G8000
Appareil photo / scanner UV	Révélation des gels d'électrophorèse	Cole-Parmer WZ-97701-72
Thermomixer	Stress physique et thermique	Starlab S8012-0000
Centrifugeuse	centrifugation	Eppendorf 5425
Vortex	Mélanger / homogénéiser	IKA Vortex 2 S000
Marqueur de poids moléculaire	Déterminer la taille des fragments d'ADN sur gel amplifiés en PCR	New England BioLabs N0467S

Le séquençage Sanger de la région Ef1-alpha nécessite l'extraction de l'ADN, qui est réalisé par l'utilisation du kit QIAGEN QIAamp DNA mini kit. Chaque souche est repiquée depuis un tube cryogénique vers un tube SCAA (2 gouttes via une pipette pasteur) en réalisant des stries à l'aide d'une oese et mis à l'étuve durant 7 jours à +/- 30°C. Après une semaine, un fragment de la colonie est transféré dans un microtube 1,5 stérile ml en

utilisant une oese / écouvillon, dans lequel est ajouté 25µL de protéinase K et 475µL de tampon de lyse ATL.

Les tubes sont ensuite placés sous un thermocycleur à 65°C, 900 RPM durant toute la nuit afin de réaliser la lyse mécanique, enzymatique et thermique.

La purification de l'ADN débute par l'ajout de 200 µL d'éthanol suivi d'une centrifugation. La solution est ensuite placée dans une colonne de purification qui est mis à centrifuger, où le filtrat est jeté et la colonne placée dans un nouveau tube collecteur. L'opération se répète deux fois de suite par l'ajout de 500 µL, de tampon buffer AW1 et ensuite AW2. Finalement, l'ADN est élué via l'ajout de 500 µL de tampon d'éluion buffer AE et l'ADN est récupéré. Une

fois l'ADN purifié, les échantillons subissent une PCR afin d'amplifier l'ADN. Les échantillons d'ADN sont ensuite stockés au congélateur à -80°C. Le mix réactionnel est repris dans la [figure 58](#).

Réactifs	Volume µl (1 ech.)
Buffer II 10x	5
MgCL2 (25mM)	7
dNTP (25µM)	0,4
Ef alpha R (50µM)	0,5
Ef alpha F (50µM)	0,5
Taq (5U/µl)	0,25
Eau	26,35

Figure 58: tableau reprenant la composition du mix réactionnel pour la PCR Ef1-alpha

Les volumes des réactifs du mix réactionnel est multiplié selon le nombre d'échantillon +1 en plus du contrôle positif et négatif (eau). Une fois le mix préparé, 10 µL d'ADN est ajouté à 40 µL de mix (total 50 µL) afin de réaliser la PCR (+/- 2h). Une fois la PCR terminée, les amplicons sont analysés sur un gel d'électrophorèse en ajoutant 10 µL d'amplicons et 10 µL d'eau stérile. Les gels utilisés sont des gels d'agarose Egel 2%, qui sont fournis sous forme de cartouches prêtes à l'emploi, ce qui facilite leur manipulation et leur utilisation.

Une colonne est réservé au poids moléculaire, une au contrôle positif et une au contrôle négatif. Une fois la confirmation du bon déroulement de la PCR faite (en observant l'apparition d'une bande à +/- 660 pb correspondant au gène Efl-alpha), les échantillons sont séquencés selon la méthode Sanger, via un dépôt de 12 µL d'amplicons (cf figure 59). S'en suit une étape de normalisation à 4 ng/uL de manière automatisée. Les manipulations de séquençage sont effectuées par le service commun de biologie moléculaire du CHU et sont rendus disponibles généralement le lendemain du séquençage dans les serveurs du CHU de Liège.

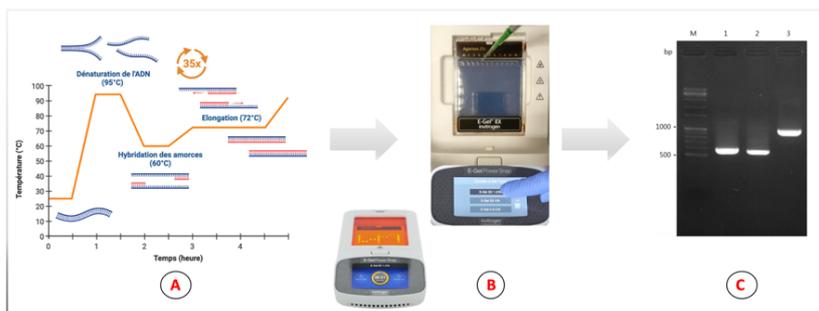


Figure 59 : Figure représentant les différentes étapes de la PCR Efl-alpha (A) suivi de l'analyse par électrophorèse sur gel (B-C).

3.7 Séquençage haut débit NGS Illumina

La liste du matériel utilisé est reprise dans le tableau ci-dessous :

Matériel	Usage	Référence
Écouvillon stérile	Prélèvement / repiquage	Aptaca 5100/SG/2
Oese stérile	Prélèvement / repiquage	VWR 612-9356P
Incubateur / étuve	Croissance fongique	Memmert UNE 600
Bec-Bunsen	Stérilisation du matériel / environnement	WLD-TEC GmbH Fuego SCS basic RF
Hotte à flux laminaire	Stérilisation de l'environnement	ESCO AC2-4S8-TU
Tube cryogénique / lait	Conservation des souches/matériel	DELTALAB 409113/2 / Thermo Scientific 377224
Congélateur (-80°C)	Conservation des souches/matériel	Thermo Scientific Ultralow Freeze 907
Pipette pasteur	Transfert de liquides en tous genres	Copan 201CS01
Tube Falcon 50	Mise en culture liquide	Sarstedt AG & Co 62.547.254
DNeasy® UltraClean® Microbial kit (50)	Kit d'extraction génomique	Qiagen 12224-50
Azote liquide	Choc thermique	/
Vortex	Choc mécanique / homogénéisation	IKA Vortex 2 S000
Bain-marie	Choc-thermique	STARLAB N2400-4002
Spectrophotomètre	Appréciation de la qualité et rendement d'extraction	Thermo Scientific ND-1000
Micropipette 2 µL		RAININ Pipet-Lite LTS 0.1 – 2 µL
Micropipette 10 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 0.5 – 10 µL
Micropipette 20 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 2 – 20 µL
Micropipette 100 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 10 – 100 µL
Micropipette 200 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 20 – 200 µL
Micropipette 1000 µL	Prélèvements / Transferts divers	RAININ Pipet-Lite LTS 100 – 1000 µL
Séquenceur Illumina	Séquençage haut débit	Illumina Novaseq 6000
Autoclave	Stériliser	Tuttnauer 3850EL

Le séquençage haut débit réalisé par la plateforme GIGA-genomics (CHU de Liège) débute par la préparation d'une culture de suspension fongique liquide, qui est réalisée en pipétant (via une pipette pasteur) 2 gouttes de la souche à cultiver prélevée à partir d'un tube cryogénique provenant du congélateur -80°C, dans un tube falcon 50ml

contenant 15-20ml de milieu Sabouraud. Le milieu Sabouraud a été préparé (selon le même procédé qu'au point 3.2.3 sans l'ajout d'agar-agar) et préalablement autoclavé (121°C). Le tube est ensuite mis à l'étuve pour une incubation d'une semaine à +/- 30°C.

Après une semaine d'incubation, le floccule fongique se trouvant au fond du tube est récupéré à l'aide d'une oese et mis dans un tube PowerBead (contenant des billes). L'extraction d'ADN est réalisée en utilisant le kit Qiagen DNeasy™ UltraClean Microbial (simplifié en Kit Qiagen) dont le protocole complet peut être téléchargé [ici](#). Après ajout de solutions de lyse (PowerBead et SL), les échantillons subissent un cycle triphasique composé d'une lyse thermique, mécanique et enzymatique (par l'ajout de tampons de lyse), respectivement en les plaçant dans de l'azote liquide (1min) ensuite directement à une température de 56°C dans un bain marie (durant 10 minutes) et finalement 10 minutes dans un vortex (sous l'agitation rapide, les billes frappent et fragilisent les cellules fongiques).

Après centrifugation, le surnageant est transféré dans un tube collecteur dans lequel est rajouté une solution IRS. Le tube est de nouveau centrifugé et le surnageant est transféré dans une colonne de purification en silice Qiagen dans laquelle est rajoutée une solution SB. Après centrifugation, le SB est jeté et l'ADN est purifié par l'ajout d'une solution CB. Après centrifugation, l'ADN est élué par l'ajout de la solution EB. Une fois élué, l'ADN est dosé à l'aide d'un spectrophotomètre (Nanodrop) afin d'apprécier le rendement et la qualité d'extraction, en déposant 2 µL d'ADN au spectrophotomètre Nanodrop à l'aide d'une pipette 2 µL (cf figure 60).



Figure 60 : schéma simplifié de l'extraction d'ADN (kit Qiagen)

Schéma simplifié illustrant les diverses étapes d'extraction génomique en utilisant le kit Qiagen. Après la récolte du flocule fongique, celui-ci est lysé par l'ajout de tampons, de manière mécanique et thermique. S'en suit une série de centrifugation et lavage et finalement l'élué de l'ADN.

Source : adapté de Qiagen, 2020

Le dosage consiste à mesurer l'absorbance de l'échantillon à une longueur d'onde spécifique (260 nm) pour déterminer sa concentration, tout en prenant en compte la mesure de l'absorbance à 280 nm pour corriger les effets des contaminants tels que les protéines. L'analyse du rapport 260/280 est importante dans cette technique car elle permet d'évaluer la pureté de l'échantillon (106). Finalement, les échantillons sont envoyés au GIGA qui effectue le séquençage par synthèse Illumina (séquençage haut débit de seconde génération).

3.8 Traitement des données de séquençage

Les analyses des données de séquençage est une étape importante car elle permet de répondre à des difficultés de la routine, en particulier au manque d'outils de discrimination dû au manque de polymorphisme morphologique entre les espèces de la. Série *T. mentagrophytes*.

3.8.1 Données de séquençage Sanger

Une fois séquencés, les résultats de séquençage sont disponibles sur les serveurs du CHU de Liège. Le couple d'amorces utilisé est conçu pour cibler le gène *Efl-α* des dermatophytes. Les données de séquençages sont rendus dans une extension de type ab1 associés à des fichiers de séquençage génomique, avec un fichier contenant la séquence forward (R1) et un contenant la séquence reverse (R2) correspondant au brin sens et antisens respectivement. En moyenne, la taille du gène *Efl-α* pour les séquençages qui ont donné des résultats concluants est d'environ 660 paires de bases (pb), pour les séquençages non concluants en raison de dysfonctionnements, la taille moyenne du gène *Efl-α* est d'environ 86 pb et n'ont pas été pris en considération. Les résultats de séquençage Sanger retenus incluent une R1 et R2 complète et/ou au moins une R1 ou R2, où la séquence complémentaire est produite par un assemblage in silico par l'utilisation du logiciel 4Peaks (option FLIP).

3.8.2 Données de séquençage Illumina NovaSeq6000

Les données de séquençage obtenues par la technologie Illumina sont rendues sous forme de 2 fichiers FASTQ par échantillon, un pour le sens forward (R1) et le second pour le sens reverse (R2). Les fichiers FASTQ sont des fichiers texte contenant des millions de séquences d'ADN courtes (généralement 100-300 paires de bases de longueur), accompagnées d'un score de qualité associé à chaque base, ce qui permet d'évaluer la fiabilité de la séquence à cette position. Un contrôle de l'intégrité des données a été effectué lors du transfert des fichiers FASTQ vers un disque dur externe, afin de s'assurer qu'aucune modification n'a été produite durant le transfert

Ce contrôle a été réalisé en utilisant l'outil **Hash MD5**, étant un algorithme de hachage cryptographique. L'algorithme MD5 prend en entrée un flux de données de longueur arbitraire et produit en sortie une empreinte numérique de 128 bits (comme une sorte de signature numérique appelée hash).

```
@A00801:346:HNSLMD5X5:2:1101:8567:1016 1:N:0:NTAACTGGT+AGGTATGGCG
GGTTTGATTATGTAATCATGAACATCGAGCCACTTCAATGAATTGGAGAAGCCGAATACATCCAGTCCATCGTTTTGATATACGATTGATAGCTCGGTAAGTTGACTGCTGCTTG
+
FFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFFF
```

- > La 1^{ère} ligne (débutant par un @) comprend les informations d'identification avec :
 - A00801 : identification du séquenceur
 - 346 : identification du run
 - HNSLMD5X5 : identification de la flow cell
 - 2 : identification de la rangée (lane)
 - 8567:1016 : coordonnées géographiques x et y sur la flow cell
 - NTAACTGGT+AGGTATGGCG : séquences d'index
- > La 2^{ème} ligne correspond à la séquence
- > Le 3^{ème} ligne est un séparateur de ligne caractérisée par le symbole « + »
- > La 4^{ème} ligne correspond aux scores de qualité → les scores de qualité sont encodés sous une forme compacte et sont représentés par un caractère avec un code ASCII égal à sa valeur + 33. Le score le plus faible étant de 33 (0+33a) et le plus haut de 73 (40+33)

Figure 61 : format d'un fichier FASTQ
Représentation et définition des divers éléments retrouvés dans un fichier FASTQ.

Cette empreinte numérique est calculée de telle sorte que toute modification apportée aux données d'entrées, même mineures, produira une empreinte numérique différente par rapport au fichier original. Le format FASTQ est composé de quatre lignes pour chaque séquence de lecture (cf figure 61).

Cependant, puisque ce format de fichier est assez lourd (+/- 1 Go pour les espèces de la série *T. mentagrophytes*) de par les informations attribuées aux millions de séquences, les fichiers FASTQ sont converties en fichier FASTA. Le format FASTA est une version simplifiée du format FASTQ, sans les scores de qualité associés à chaque base (cf figure 62). Les fichiers FASTQ sont convertis en fichier FASTA par l'utilisation du logiciel WGS-Typer (WGST), créé en 2020 par la spin-off Hedera 22 de l'Uliège.

```
>13-220318-0011
CACATTAAC TTGGTGGTATCGGACGCTGATTCCGGCAATCCACCACTACTGGTAAGCCAGCCACGAGATATACATACCACTAGCCAGGCACACACT--
ACACAGAANTGACTATAACAATTACAGGTCACTGATCTACAAGTGGGTGGTATCGACCCAGCGTACCATTGAGAAGTTGAGAAGTAATAACCTTTTTTT
GACCCTGCTGTGTTGGTGTGCTGCACATTTTCTCTCCCTTTCTTCAACCACACAGGCGACTTTTTTTGTGCTTGGTGGATGTGGCTGGCACTCG
CTTGGGCAGCAAAATCACCCCCACCAACATCAAACATGCGAGCCATCGCTCCAGGCAAGATCGAGCCATGTCATGTTGAGATTGCTTTTTTCTGCTTCA
GGTTCGATGCTAACAAAGTACTGTAGGAAGCCGAAAGATTGGGCAAGAAGCTCTTCAAGTACGCTTGGGTTCTTGACAAGCTCAAGGCCAGCGTGAAGCTGTA
TCACATCGATTCGCCCTCGGAAGTTCGAGACCCCAAGTACAATGTCACCGCTATTGGTATG-
TTTCTTTTACCTTTCCCTCCATCGTCTTGCTGTGCCATAAACAAGAGAGTAGAGCCGCCCGGTGACTTCAATCAAGAATGATCATCGTGTACCTCC
AGGCTGACTGTGCTATTCTCATCTATTGCTGCCGCTACTGGTGAGTTGAGGCTGGTATCTCCAAGGAT
```

Figure 62 : format d'un fichier FASTA
Un fichier FASTA est constitué d'un en-tête de description commençant par ">" et suivi de la séquence composée d'acides aminés ou de bases nucléotidiques.

3.9 Stratégie d'assemblage

La stratégie d'assemblage représente l'approche utilisée afin de reconstituer le génome à partir de données brutes de séquençages. Après des investigations ultérieures menées lors de la mise au point de la stratégie d'assemblage, il a été déterminé que celle utilisée par le WGS typer était la plus performante (107).

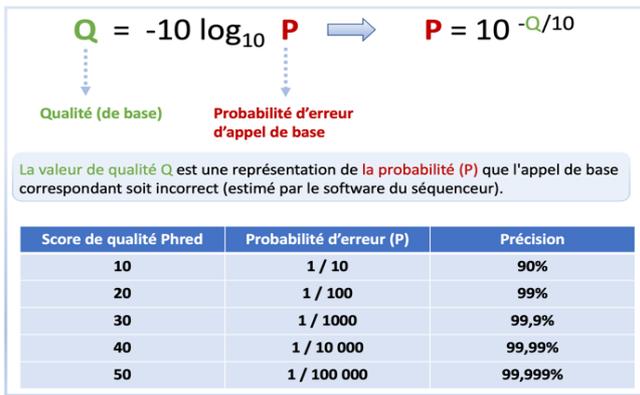


Figure 63 : score de qualité Phred.

Le score de qualité Phred est obtenu en comparant les intensités des pics de fluorescence mesurées à chaque base à un modèle de distribution de probabilité de bruit de fond, puis en convertissant les résultats en une échelle logarithmique de probabilité d'erreur de base. De cette manière, un score de qualité Phred de 40 correspond à une probabilité d'erreur de base d'un sur 10 000 et donc à une précision de 99,99%.

Cette étape est cruciale car elle conditionne la qualité de la séquence génomique. Cela est rendu possible en réalisant un alignement de séquence, en configurant un seuil de qualité ou encore en analysant la distribution des k-mères. De manière générale, un score de qualité ($Q \geq 20$) est retenu car il indique une forte probabilité de confiance (cf figure 64).

Le WGS-Typer a recours à l'outil SPAdes, qui utilise une stratégie de graphe de De Bruijn afin de réaliser l'assemblage, qui consiste à fragmenter une séquence / read en k-mères (ou fragments) pour construire un graphique où les k-mères sont représentés par des nœuds et où les liens entre ces nœuds représentent des zones de chevauchement. SPAdes permet également de réaliser un pré-traitement (pré-filtrage) des données afin de corriger des nucléotides mal identifiés, d'éliminer les séquences de mauvaise qualité ou encore les adaptateurs (cf figure 63).

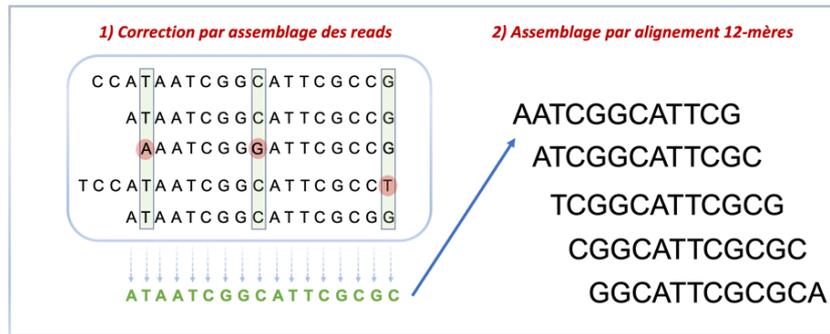


Figure 64 : Assemblage de Novo

- 1) Une étape de préfiltrage permet de corriger et/ou améliorer les séquences assemblées. Cette étape passe notamment par la correction par assemblage des reads.
- 2) Les reads sont ensuite assemblés pour former des contigs eux-mêmes assemblés en scaffolds, utilisés dans le but de construire le génome entier.

3.10 Analyse des marqueurs moléculaires

L'analyse des marqueurs moléculaires nécessite au préalable un assemblage des fichiers FASTQ (R et F) réalisé à partir de l'outil WGST. Dix-huit marqueurs moléculaires sont ensuite analysés au sein des génomes assemblés, en utilisant l'outil TblastN (108). TblastN permet de rechercher des marqueurs moléculaires à partir de séquences nucléotidiques, en comparant ces dernières avec des bases de données de protéines annotées pour trouver des régions similaires. Un seuil de détection est paramétré dans le programme WGST, permettant de considérer qu'un marqueur est absent lorsque le seuil est inférieur à 60% (ou à une couverture de 20%). Dans le cas contraire, un message d'erreur « below thresholds » s'affiche en rouge. Les marqueurs moléculaires ciblés comprennent des enzymes virulence de la famille des subtilisines (Sub1,2,3,6), **fungalsines** (Mep1,2,3,4,5), **dipeptidyl peptidases** (Ddp4,5), le gène **TruMDR3** codant pour une protéine de transport membranaire de la superfamille ABC dont la surrexpression confère une résistance aux

Mep1 variant positions 249 not in alignment	TruMDR3	ScpA
Mep2	Sub1 below thresholds	ScpB
Mep3	Sub2	Dpp4
Mep4 below thresholds	Sub3	Dpp5
Mep5	Lap1	
Sub6 below thresholds	Lap2	
SQLE WT	McpA	

Figure 65 : Liste des 18 marqueurs moléculaires ciblés par WGST

Après assemblage du génome par l'outil WGST, différents marqueurs moléculaires sont recherchés au sein du génome, notamment des enzymes de virulence subtilisines (Sub), fungalsines (Mep), dipeptidyl peptidases (Ddp4,5), ou encore une mutation au sein du gène de la SQLE conférant une résistance à la terbinafine. En plus de la recherche de marqueurs, il est possible de créer un dendrogramme à partir des différents génomes assemblés.

antifongiques azolés ou encore des protéines d'adhérences cutanées (Lap1,2, Scpa, Scpb) (109 ; cf figure 65 & 9). En ce qui concerne le gène de la **SQLE**, différentes mutations sont recherchées, à savoir : L393, F397, F415 et H440, si aucune d'entre-elles n'est détectée, le gène est considéré comme sauvage / wild-type (WT). Ces marqueurs de mutations ont été définis et sélectionnés sur base de la littérature et de leur influence sur l'effet pathologique préalablement décrits par des scientifiques. Les marqueurs sélectionnés jouent un rôle soit dans la résistance soit dans la virulence du champignon.

3.11 Identification des souches traitées

Différentes approches bioinformatiques ont été menées afin d'identifier et discriminer les souches traitées. Les approches se basent soit sur l'étude du génome entier (phylogénomique) soit sur l'étude d'un gène en particulier (phylogénétique).

3.11.1 Approche phylogénomique

L'approche phylogénomique est pertinente pour discriminer les espèces fort apparentées comme les dermatophytes appartenant à la série *T. mentagrophytes* car elle permet de comparer l'ensemble du génome plutôt qu'un seul gène, ce qui peut être avantageux lorsque qu'un gène d'intérêt manque de polymorphisme alors que d'autres régions pourraient contenir des informations phylogénétiques importantes. L'approche phylogénomique étudiant l'intégralité du génome (WGS) se base sur la création d'un dendrogramme (arbre phylogénomique) à partir des génomes assemblés par l'outil WGST, en y incluant des génomes de références. A savoir, **CBS130940 Genbank : KM678173.1** (pour *T. interdigitale*), **CBS:102.68 (D15P127) Genbank : KM678062.1** (pour *T. mentagrophytes*) et **TIMM20114** (pour *T. indotineae*).

3.11.2 Approche phylogénétique

L'approche phylogénétique consiste à créer un arbre phylogénétique par maximum de vraisemblance (MLT pour Maximum Likelihood Tree) à partir des séquences Efl- α obtenues par séquençage Sanger.

• **Séquençage Sanger** : celles-ci sont regroupées au sein d'un même fichier texte sous format FASTQ, en plus des 3 souches de références (KM678062.1, MR816 et TIMM20114) pour le gène Efl-alpha (où chaque séquence (R1 et R2) est précédée par son numéro d'identification GLIMS). Les séquences sont ensuite alignées entre-elles en utilisant l'algorithme MAFFT (paramètres par défaut) générant un fichier à extension .aln qui sera lu par RAXMLGUI permettant de générer un arbre par maximum de vraisemblance sur base des alignements. L'arbre est ensuite exporté sous format .bestTree et est lu par iTOL. L'avantage de cette approche est qu'elle est indépendante des BD. L'intérêt de cette approche est de vérifier si des clades distincts apparaissent permettant la discrimination des différentes espèces de la série *T. mentagrophytes*. De la même façon sera généré un arbre à partir des données de séquençage Illumina concernant le gène Efl-alpha et ITS2.

• **Séquençage haut débit Illumina** : les séquences Efl-alpha et ITS2 ont été extraites en utilisant l'application Terminal sur MacOS X (correspondant à l'invite de commandes / Powershell pour le système Microsoft). S'en suit le blast du gène Efl-alpha à partir du gène de référence *T. mentagrophytes* (référence : KM678062.1) pour tous les fichiers FASTA obtenus après séquençage Illumina. Cela est réalisé en utilisant l'outil Blastn version 2.13.0+ dmg (nucléotide : nucléotide).

The background features a complex pattern of overlapping hexagons in various colors (brown, teal, green, orange) and sizes. Some hexagons are solid, while others are outlines. A central rectangular box is divided diagonally from the top-right corner, with a light beige section on the left and a reddish-orange section on the right. The word "Résultats" is centered in the beige section.

Résultats

4. Résultats

Le nombre total de souches incluses dans l'étude est de 173. Parmi l'ensemble des échantillons, 44 n'ont pas été prises en compte pour diverses raisons, principalement par manque de temps (cf figure 66). Parmi les 129 souches restantes, toutes n'ont pas pu être traitées / séquencées par les diverses méthodes par manque de temps.

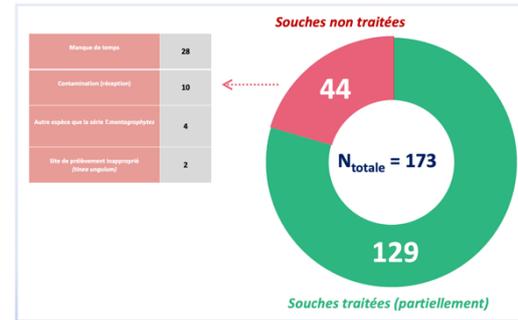


Figure 66 : Représentation du nombre de souches de l'étude traitées et non traitées.

Parmi le pool d'échantillons :

- 129 soit 100% ont été traités par screening rapide 12 puits
- 110 soit 85,3% ont été traités par la méthode EUCAST E.Def 11.0
- 121 soit 93,8% ont été séquencés par la méthode Sanger
- 88 soit 68,2% ont été séquencés par la méthode Illumina

4.1 Résultats dermacheck (plaque 12 puits)

Sur les 129 échantillons, 127 soit 98,4% étaient sensibles (aucune croissance au-delà du 1^{er} puit) à la terbinafine. Seul 1,6% soit 2 souches ont montré une résistance à la terbinafine, où une croissance était visible au-delà du 3^{ème} puit. A savoir, la souche portant le numéro GLIMS 13-221207-0054 (ERT106) ainsi que 13-230220-0021 (ERT133) cf figure 67

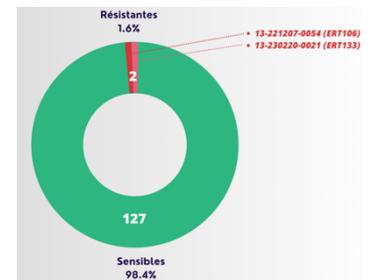


Figure 67 : résultat du test dermacheck.

4.2 Antifongigramme EUCAST E.DEF.11.0

Sur les 110 souches testées, la CMI₅₀ de la terbinafine pour :

108 souches avaient une valeur de CMI inférieure à l'ECOFF défini par l'EUCAST pour la terbinafine (0,125 µg/ml), soit 98,2% de souches sensibles.

- 2 souches soit 1,8% ont été identifiées comme résistantes, avec une CMI₅₀ allant de 2 µg/mL à plus de 8 µg/mL, pour les souches ERT133 et ERT106 respectivement (cf figure 68), identiques aux

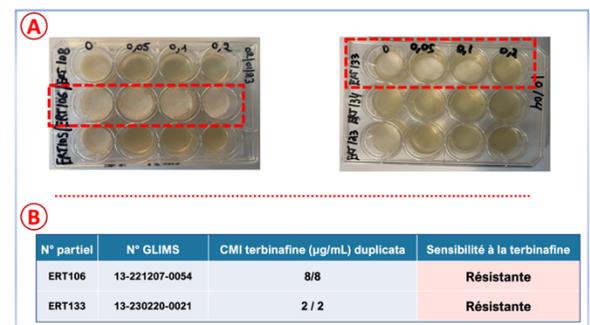


Figure 68 : Concordance du profil de résistance entre le test de screening rapide (A) et le test de confirmation par microdilution EUCAST E.DEF.11.0 (B) pour les souches ERT106 et ERT133.

Concentration (µg/mL)	Souches sensibles	Souches résistantes	Moyenne (µg/mL) +/- SD
0,008	27	0	0,026 +/- 0,019 5 +/- 3
0,016	28	0	
0,03	26	0	
0,06	22	0	
0,125	5	0	
2	0	1	
8	0	1	

Figure 69 : CMI moyenne accompagnée de l'écart-type pour les souches sensibles et résistantes.

deux souches précédentes.

- La CMI moyenne (+/- l'écart-type) pour les souches sensibles est de 0,026 µg/mL (+/- 0,019 µg/mL). Pour les souches résistantes, la CMI moyenne est de 5 µg/mL (+/- 3 µg/mL) cf figure 69.

4.3 Caractérisation par séquençage haut débit

Parmi les souches séquencées par la méthode Illumina, 93,2% soit 82 souches ont été identifiées comme appartenant à la série *T. mentagrophytes* à l'exception de 6 souches soit 6,8%. À savoir, ERT23, 85, 102 ont été identifiées comme *T. tonsurans*, ERT77 comme *T. rubrum*, ERT101 comme *T. benhamiae* et ERT111 comme *T. verrucosum* (cf figure 69). Les 6 souches identifiées semblent très probablement être des erreurs d'identification de la part des laboratoires participants et ont par conséquent été exclues de l'étude, **portant le nombre total de souches traitées et analysées par WGS à 82.**

4.3.1 Analyse des marqueurs moléculaires

L'analyse des marqueurs est réalisée par l'outil WGST, depuis le CHU de Liège, puisqu'une connexion au sein des serveurs du service interne de microbiologie est nécessaire.

Dix-huit marqueurs d'intérêts sont ciblés (cf point 3.10), à savoir : des **subtilisines** (Sub1,2,3,6), **fungalsines** (Mep1,2,3,4,5), **dipeptidyl peptidases** (Ddp4,5), le gène **TruMDR3**, des protéines **d'adhérences cutanées** (Lap1,2, Scpa, Scpb), la protéine chimiotactique des monocytes-1 dermatophyte (**MCP1**) et le gène de la **SQLE**. Après analyse, 79 souches soit 96,3% présentent un profil moléculaire identique du point de vue des marqueurs ciblés (cf figure 71).

Marqueurs	Présence / Absence
Mep1	Non aligné
Mep2	Présent
Mep3	Présent
Mep4	Seuil non atteint
Mep 5	Présent
Sub 6	Seuil non atteint
SQLE	WT
TruMDR3	Présent
Sub1	Seuil non atteint
Sub2	Présent
Sub3	Présent
Lap1	Présent
Lap2	Présent
Mcp1	Présent
ScpA	Présent
ScpB	Présent
ddp4	Présent
ddp5	Présent

Figure 71 : Profil moléculaire prédominant des souches caractérisées par l'outil WGST.

Les gènes MEP2-3-5, Sub2-3, Lap 1-2, SQLE, TruMDR3, Mcp1, ScpA-B, ddp4-5 sont exprimés par la majorité (96,3%) des souches de l'étude. Cependant, pour la même majorité, le gène Mep1 était systématiquement non aligné et les gènes Mep4, Sub1-6 n'étaient pas détectés puisque le seuil de détection n'était pas respecté, se traduisant par la non présence de ces marqueurs.

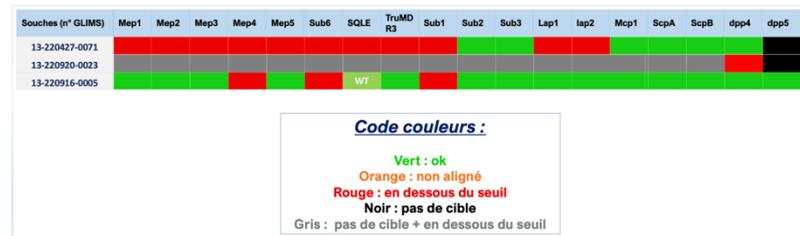


Figure 72 : Profil moléculaire atypique des souches 13-220427-0071, 13-220920-0023 et 13-220916-0005.

Cependant, 3 souches soit 3,7% présentaient un profil différent de la majorité, à savoir, les souches portant le numéro GLIMS 13-220427-0071, 13-220920-0023 et 13-220916-0005 (cf figure 72).

4.3.2 Analyse du dendrogramme

Un dendrogramme a été généré par l'outil WGST sur base de l'intégralité du génome, à partir des données de séquençage Illumina. Parmi les 82 souches retenues, 21 souches soit 25,6% ont été identifiées comme *T. mentagrophytes sensu stricto*, 1 souche soit 1,2% comme *T. indotineae* et 60 souches soit 73,2% comme *T. interdigitale*. Les souches portant des mutations au sein du gène SQLE sont encadrées en rouge et en mauve pour les espèces caractérisées comme *T. mentagrophytes* et *T. indotineae* respectivement (cf figure 70).

Profil patients		Souches		Identification par	Site(s) de prélèvement						
Age (année)	Sexe	N° GLIMS	Séquençage Illumina	Tinea capitis	Région faciale	Tinea corporis	Bras et main	Région Périnéale	Jambe	Tinea pedis	
4	M	13-220318-0011	<i>T. mentagrophytes</i>								
60	M	13-220318-0012	<i>T. mentagrophytes</i>								
30	M	13-220318-0013	<i>T. mentagrophytes</i>								
34	M	13-220405-0024	<i>T. mentagrophytes</i>								
34	M	13-220412-0006	<i>T. interdigitale</i>								
51	F	13-220419-0028	<i>T. interdigitale</i>								
62	M	13-220421-0058	<i>T. interdigitale</i>								
28	M	13-220422-0007	<i>T. mentagrophytes</i>								
64	M	13-220421-0070	<i>T. interdigitale</i>								
50	M	13-220427-0071	<i>T. interdigitale</i>								
24	F	13-220428-0014	<i>T. interdigitale</i>								
24	F	13-220428-0057	<i>T. mentagrophytes</i>								
19	M	13-220503-0016	<i>T. interdigitale</i>								
41	M	13-220505-0009	<i>T. interdigitale</i>								
6	F	13-220505-0025	<i>T. interdigitale</i>								
63	M	13-220517-0004	<i>T. interdigitale</i>								
50	M	13-220517-0005	<i>T. interdigitale</i>								
67	F	13-220518-0031	<i>T. interdigitale</i>								
30	F	13-220527-0001	<i>T. mentagrophytes</i>								
33	M	13-220527-0002	<i>T. interdigitale</i>								
43	M	13-220527-0003	<i>T. interdigitale</i>								
23	M	13-220601-0044	<i>T. interdigitale</i>								
30	M	13-220609-0003	<i>T. interdigitale</i>								
58	F	13-220613-0219	<i>T. interdigitale</i>								
57	F	13-220615-0052	<i>T. interdigitale</i>								
20	M	13-220616-0003	<i>T. mentagrophytes</i>								
34	F	13-220615-0053	<i>T. mentagrophytes</i>								
30	M	13-220629-0072	<i>T. mentagrophytes</i>								
30	M	13-220629-0073	<i>T. mentagrophytes</i>								
77	M	13-220704-0026	<i>T. interdigitale</i>								
66	F	13-220616-0045	<i>T. interdigitale</i>								
15	M	13-220621-0008	<i>T. interdigitale</i>								
61	F	13-220628-0033	<i>T. interdigitale</i>								
30	M	13-220706-0007	<i>T. interdigitale</i>								
54	M	13-220706-0006	<i>T. mentagrophytes</i>								
90	F	13-220726-0022	<i>T. interdigitale</i>								
78	F	13-220707-0018	<i>T. interdigitale</i>								
30	M	13-220706-0008	<i>T. interdigitale</i>								
46	M	13-220726-0023	<i>T. mentagrophytes</i>								
41	M	13-220801-0012	<i>T. interdigitale</i>								
69	M	13-220816-0037	<i>T. interdigitale</i>								
72	F	13-220816-0043	<i>T. interdigitale</i>								
43	M	13-220816-0048	<i>T. interdigitale</i>								
70	F	13-220816-0056	<i>T. interdigitale</i>								
27	M	13-220817-0025	<i>T. interdigitale</i>								
63	F	13-220817-0026	<i>T. interdigitale</i>								
16	F	13-220816-0053	<i>T. interdigitale</i>								
28	M	13-220817-0027	<i>T. interdigitale</i>								
41	M	13-220830-0064	<i>T. mentagrophytes</i>								
69	M	13-220902-0009	<i>T. interdigitale</i>								
3	F	13-220916-0005	<i>T. mentagrophytes</i>								
48	F	13-220920-0023	<i>T. interdigitale</i>								
56	M	13-220928-0046	<i>T. interdigitale</i>								
5	M	13-221011-0023	<i>T. interdigitale</i>								
38	F	13-221011-0046	<i>T. interdigitale</i>								
38	M	13-221103-0009	<i>T. interdigitale</i>								
37	F	13-221115-0050	<i>T. interdigitale</i>								
81	M	13-221115-0051	<i>T. interdigitale</i>								
79	M	13-221115-0053	<i>T. interdigitale</i>								
37	F	13-221115-0055	<i>T. interdigitale</i>								
85	M	13-221115-0056	<i>T. interdigitale</i>								
66	M	13-221115-0057	<i>T. interdigitale</i>								
62	M	13-221115-0058	<i>T. interdigitale</i>								
84	M	13-221115-0060	<i>T. interdigitale</i>								
75	F	13-221115-0059	<i>T. interdigitale</i>								
6	M	13-221115-0064	<i>T. mentagrophytes</i>								
71	M	13-221115-0061	<i>T. interdigitale</i>								
38	M	13-221115-0063	<i>T. mentagrophytes</i>								
41	F	13-221117-0088	<i>T. interdigitale</i>								
56	F	13-221207-0052	<i>T. interdigitale</i>								
	M	13-221207-0054	<i>T. indotineae</i>								
57	M	13-221207-0067	<i>T. interdigitale</i>								
28	F	13-221207-0064	<i>T. interdigitale</i>								
51	F	13-221215-0002	<i>T. mentagrophytes</i>								
26	M	13-221219-0054	<i>T. interdigitale</i>								
17	F	13-221223-0061	<i>T. interdigitale</i>								
40	F	13-230103-0020	<i>T. interdigitale</i>								
58	F	13-230103-0024	<i>T. mentagrophytes</i>								
24	F	13-230103-0016	<i>T. mentagrophytes</i>								
20	F	13-230103-0025	<i>T. mentagrophytes</i>								
55	M	13-230106-0048	<i>T. interdigitale</i>								
79	M	13-230105-0037	<i>T. interdigitale</i>								

Figure 74 : Illustration de la répartition des espèces en fonction des différents sites de prélèvements et indication du profil des patients.

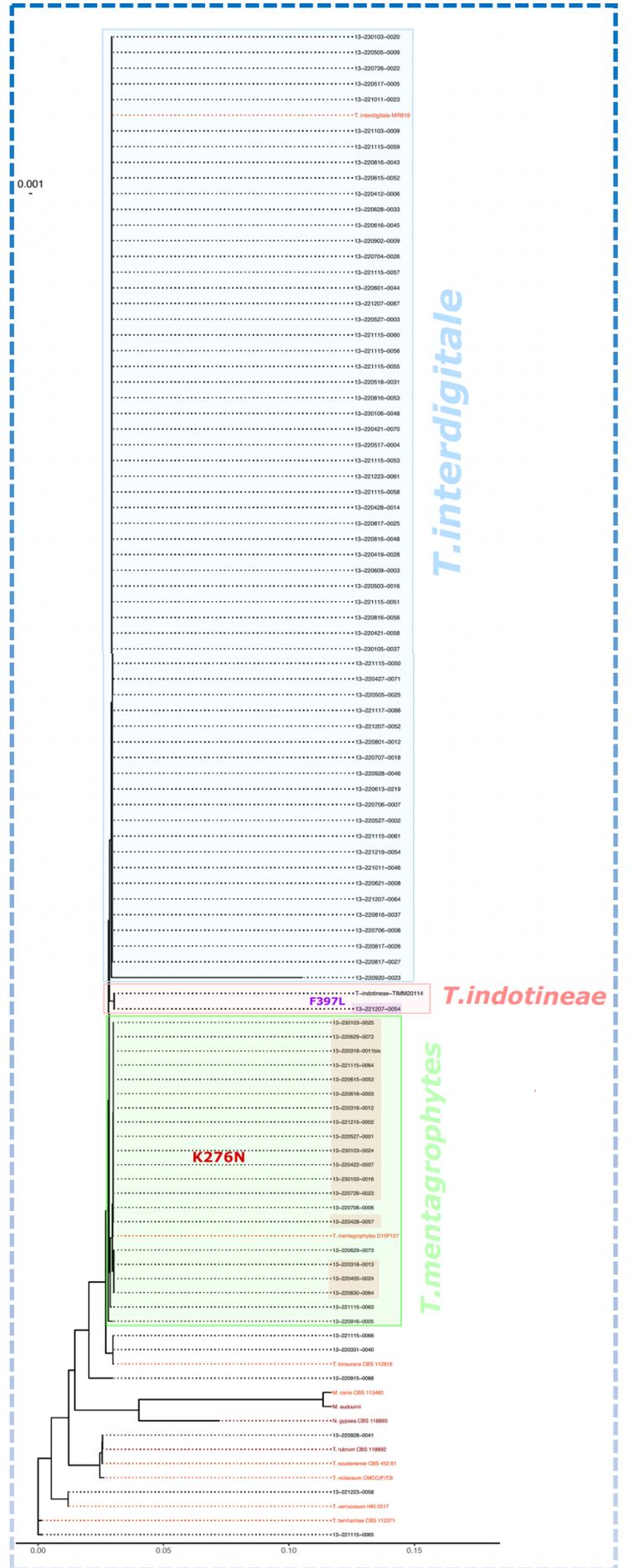


Figure 70 : Dendrogramme généré à partir des données de séquençage Illumina par l'outil WGST. Les souches mutantes pour le gène de la SQLE sont encadrées en rouge et mauve respectivement pour les souches caractérisées comme étant des *T. mentagrophytes* et *T. indotineae*.

En ce qui concerne le gène de la SQLE, 85,7% (18 sur 21) des souches de *T. mentagrophytes* présentaient la mutation K276N, tandis que 14,3% (3 souches) au sein de cette espèce, étaient de type WT. Toutes les 60 souches de *T. interdigitale* (100%) étaient de type WT et l'unique souche de *T. indotinea* était porteuse de la mutation F397L (cf figure 70). Les souches portant des mutations sur le gène SQLE sont encadrées en rouge et en mauve pour les espèces caractérisées comme *T. mentagrophytes* et *T. indotinea*, respectivement (cf figure 73).

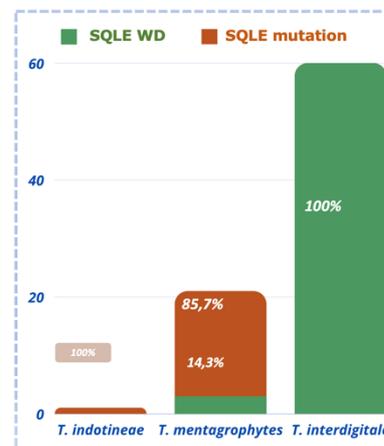


Figure 73 : Répartition du type et pourcentage de mutants / sauvage pour le gène de la SQLE.

Une caractérisation des souches a également été effectuée sur base du site de prélèvement, comprenant le cuir chevelu, la région faciale (visage, barbe, conduit auditif externe), les bras et mains, le thorax, la jambe, la cuisse, le genou, le tronc, la région périnéale (fesses, aine) ainsi que les pieds (*tinea pedis*) comprenant la voûte plantaire, les espaces inter-orteils et le talon (cf figure 74 et 75).

Parmi l'ensemble des prélèvements :

- 80% des souches soit 48 échantillons identifiés comme *T. interdigitale* sont retrouvés à partir des prélèvements provenant de *tinea pedis* (talons et espaces inter-orteils) et 20% soit 12 échantillons sont retrouvés à partir de teignes du corps dont : 1 sur le visage, 1 dans le conduit auditif externe, 4 sur le corps (localisation exacte non précisée), 3 sur le bras et 3 sur l'aine.
- 17% des souches soit 4 échantillons identifiés comme *T. mentagrophytes* sont isolés à partir de *tinea pedis* et 17 échantillons soit 83% sont isolés à partir des prélèvements isolés sur d'autres sites que le pied. A savoir, 1 sur le tronc, 3 sur le cuir chevelu, 3 sur le visage, 3 sur la jambe, 1 sur les fesses, et 5 sur le bras/poignet (certains échantillons sont isolés sur 2 sites anatomique différents).
- L'unique souche identifiée comme *T. indotinea* provient d'un prélèvement issu d'une teigne du corps (localisation précise non indiquée) cf figure 76.

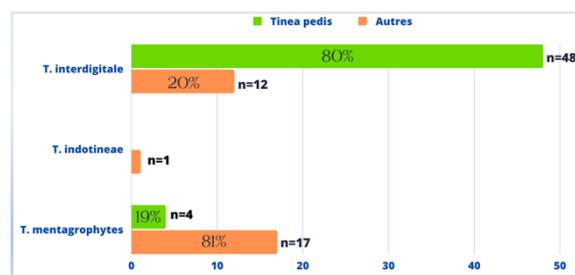


Figure 75 : Représentation de la répartition des espèces en fonction du site de prélèvement.

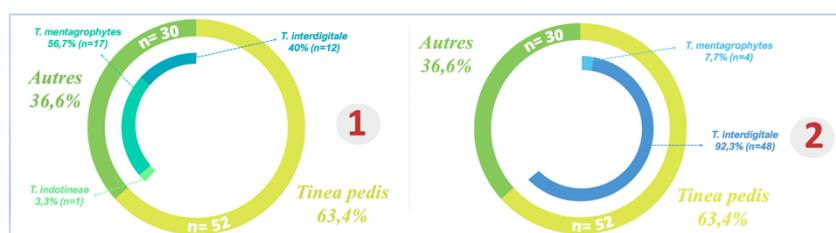


Figure 76 : Représentation de la répartition des espèces en fonction des prélèvements effectués à partir des teignes du pied (1) et autres (2).

Parmi les 52 prélèvements de l'étude issus de cas de *tinea pedis*, l'agent causal retrouvé dans 92,3% des cas (soit 48 prélèvements) est *T. interdigitale*, suivi de *T. mentagrophytes* retrouvé dans 7,7% des cas. Parmi les 30 échantillons provenant de cas de teignes autres que le tinea pedis, une prévalence dominante de l'espèce *T. mentagrophytes sensu stricto*

est observée, présent dans 56,7% des cas (soit 17 échantillons), suivi de *T. interdigitale*, présent dans 40% des cas (soit 12 souches), et de *T. indotineae*, présent dans 3,3% des cas soit 1 souche (cf figure 76).

4.3.3 Arbre phylogénétique ITS (NGS)

La méthode de référence pour le classement des souches est l'approche phylogénomique sur base du génome entier. L'arbre généré sur base de la région ITS2 (150pb) à partir des données de séquençage Illumina permet de distinguer l'espèce *T. indotineae* de *T. interdigitale* et *T. mentagrophytes* (cf figure 77). Cependant, la distinction entre *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale* n'est pas optimale. Sur les 21 souches de *T. mentagrophytes*, 4 souches soit 19% ont dû être écartées car la région ITS2 n'a pas été trouvée après alignement, il s'agit des souches :

Sur les 17 souches retenues soit 81%,

- 7 souches soit 41,2% ont été correctement classées
- 10 souches soit 58,8% ont été caractérisées comme *T. interdigitale*

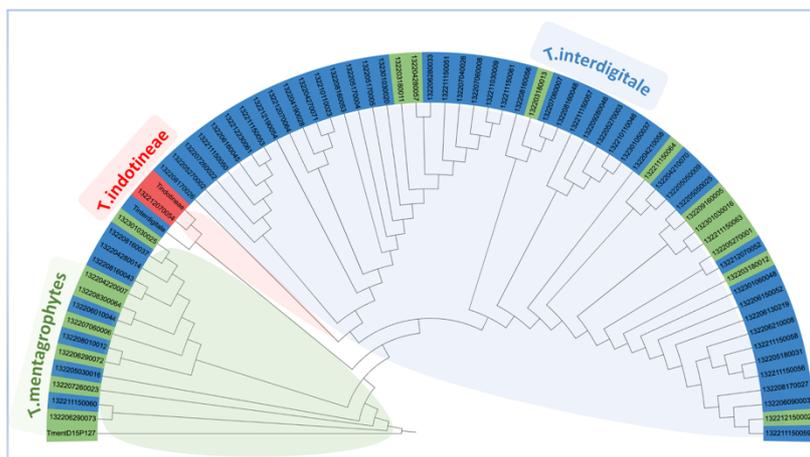


Figure 77 : Illustration de l'arbre phylogénétique obtenu à partir des résultats de séquençages NGS à partir de la région ITS2.

- 13-220613-0062 / 13220-616-0003 / 13-230103-0024 / 13-2204030024

Sur les 60 souches de *T. interdigitale*, 8 soit 13% ont été écartées car la région ITS2 n'a pas été trouvée après alignement, il s'agit des souches :

- 13-220412-0006 / 13-220903-0009 / 13-221207-0067 / 13-221115-0055 / 13-220117-0088 / 13-220707-0018 / 13-220920-0023

Sur les 52 souches retenus, soit 87% :

- 45 souches soit 86% ont été correctement classées
- 7 souches soit 13% ont été caractérisées comme *T. mentagrophytes*

4.3.4 Arbre phylogénétique Efl-alpha

L'arbre généré sur base de la région Efl- α à partir des données de séquençage Illumina permet de clairement distinguer les différents clades appartenant à la série *T. mentagrophytes*. Pour rappel, la méthode de référence pour le classement des souches est l'approche WGS. En ce qui concerne l'espèce (cf figure 78) :

- *T. mentagrophytes* : 100% des souches (21) ont été correctement classées
- *T. indotineae* : l'unique souche a été correctement classée
- *T. interdigitale* :
 - 2 souches, soit 3,3 %, ont dû être écartées car le gène Efl-alpha était incomplet ou tronqué. Il s'agit des souches portant les numéros GLIMS : 13-220427-0071 et 13-220920-0023.
 - Parmi les 58 souches restantes (96,7 %), toutes ont été correctement classées, soit un taux de classification correcte de 100 %.

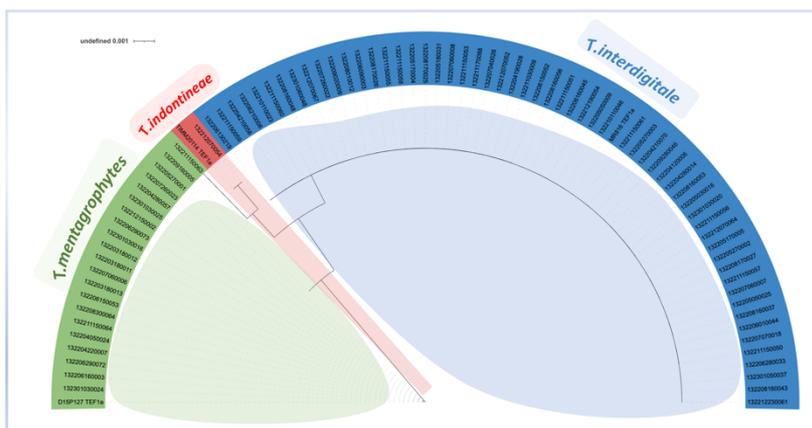


Figure 78 : Illustration de l'arbre phylogénétique obtenu en réalisant un BLAST de la région Efl-alpha à partir des données de séquençage NGS

4.4 Caractérisation par séquençage Sanger

Le séquençage de la région du facteur d'élongation 1- α par la méthode Sanger a permis de générer la séquence reverse et forward pour chaque souche séquencée. Ces séquences sont ensuite traitées afin d'éliminer les débuts et fin de séquence anarchiques pour ne conserver que la région Efl-alpha d'intérêt après un blast sur un gène de référence.

4.4.1 Arbre phylogénétique Efl-alpha

L'arbre généré sur base de la région Efl- α à partir des données de séquençage Sanger permet de clairement distinguer les différents clades appartenant à la série *T. mentagrophytes*. Un double critère d'exclusion a été défini afin de rejeter les séquences de qualité insuffisante, à savoir :

- Les séquences dont le % de gap est \geq à 2% et dont l'identité est \leq à 97% par rapport au gène de référence Efl-alpha DP15127.
 - Les souches suivantes ont par conséquent été exclues : 13-220331-0040 / 13-221115-0066 / 13-220601-0044, toutes étant identifiées comme *T. interdigitale* après séquençage haut-débit.
- Les souches 13-220816-0043, 13-221219-0054, 13-220817-0025 et 13-211115-0051 également identifiées comme *T. interdigitale* après séquençage haut-débit, ont été exclues car la taille du gène Efl-alpha était largement inférieur au gène de référence suite à un problème de séquençage (\leq 100pb contre +/- 660 pb attendu).

En ce qui concerne l'espèce (cf figure 79) :

- *T. mentagrophytes* : 100% des souches (21) ont été correctement classées
- *T. indotineae* : l'unique souche a été correctement classée
- *T. interdigitale* :
 - 7 souches, soit 11,7 %, ont dû être écartées suite aux critères d'exclusions et/ou car le gène Efl-alpha était incomplet.

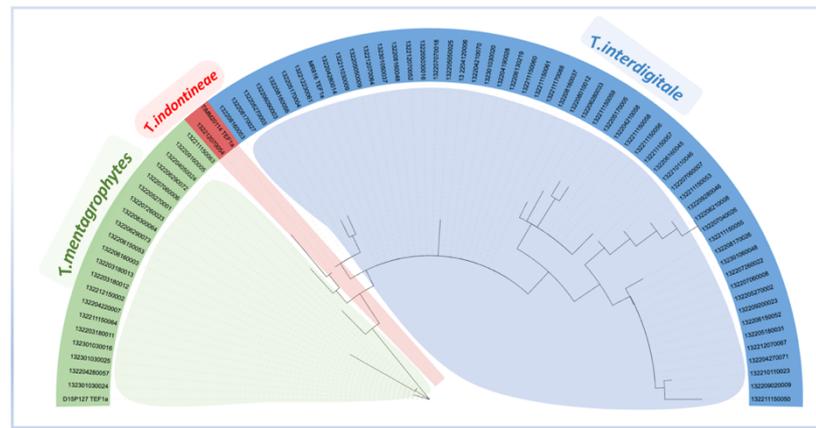


Figure 79 : Illustration de l'arbre phylogénétique obtenu suite aux résultats de séquençages Sanger à partir de la région Efl-alpha.

- Parmi les 53 souches restantes (88,3 %), toutes ont été correctement classées, soit un taux de classification correct de 100 %.

4.4.1.1 Données cliniques vs agents étiologiques

Après avoir réalisé le test du chi-carré pour évaluer l'association entre le sexe des patients et l'agent étiologique de l'infection (*T. interdigitale* / *T. mentagrophytes*), les résultats ont révélé une p-valeur supérieure à 0,05 pour les deux sexes. Par conséquent, il n'existe pas de corrélation significative entre le sexe des patients et l'agent étiologique (cf figure 80).

Test du Chi-carré		Espèce étiologique	
		<i>T. interdigitale</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
Sexe	Femme	24	8
	Homme	36	13
P-valeur		1	

Figure 80 : Test du Chi-carré établissant la relation entre le sexe et l'agent étiologique (*T. interdigitale* / *T. mentagrophytes*)

Une investigation de la relation entre l'âge des patients et l'agent étiologique de l'infection cutanée a été réalisée. Après une analyse approfondie de la normalité des données (moyenne, médiane, histogramme et test de Shapiro-Wilk), il a été constaté que la distribution des âges ne respectait pas l'hypothèse de normalité. Par conséquent, le test de Mann-Whitney a été utilisé, révélant une association significative ($p < 0,05$) entre l'âge des patients et l'agent étiologique de l'infection cutanée

(cf figure 81).

Normalité	Espèce étiologique	
	<i>T. interdigitale</i>	<i>T. mentagrophytes</i>
Moyenne +/- sd de l'âge (année)	31,67 +/- 30	49,68 +/- 50,5
Shapiro-Wilk (p-valeur)	0,2283	0,4535
Histogramme (distribution de l'âge)		
Test de Mann-Whitney (p-valeur)	0.001337	

Figure 81 : Investigation de la normalité et Test de Mann-Whitney établissant la relation entre l'âge et l'agent étiologique (*T. interdigitale* / *T. mentagrophytes*)

La moyenne d'âge pour *T. mentagrophytes* était de 31,67 ans et pour *T. interdigitale* de 49,68 ans (cf figure 82). Ainsi, ces résultats suggèrent que l'âge des patients est un facteur significativement lié à l'agent étiologique infectieux, *T. mentagrophytes* infectant plus fréquemment les sujets jeunes.

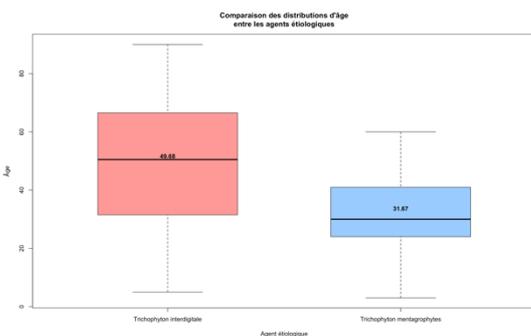


Figure 82 : Boxplot établissant la relation entre l'âge et l'agent étiologique (*T. interdigitale* / *T. mentagrophytes*)



Discussion

5. Discussion

La discussion se divise en plusieurs parties distinctes, débutant par l'examen des diverses méthodes utilisées pour établir le profil de sensibilité à la terbinafine des souches, accompagnée d'une exploration des avantages, des inconvénients et des techniques similaires utilisées. Par la suite, l'attention sera portée sur le taux de résistance de *T. indotineae* en Belgique suite à l'étude, suivi d'une comparaison avec d'autres pays. Par la suite, le sujet de la bioinformatique sera abordé, en se penchant sur les performances relatives à la discrimination des arbres basées sur les gènes ITS, Efl-alpha comparé au WGS, tout en examinant les avantages et les inconvénients des différentes approches. Enfin, l'identification des espèces sera discutée, en tenant compte de divers paramètres ayant un impact significatif d'après la littérature et les résultats obtenus dans le cadre de cette étude.

5.1 Taux de résistance à la terbinafine au cours de l'étude et discussion des méthodes employées

5.1.1 Méthodes de screening (Dermacheck).

Les dermatophytoses ont une prévalence de l'ordre de 20-25% au niveau mondial, bien que la majorité des infections ne soient mortelles, elles compromettent la qualité de vie des personnes affectées. Récemment, de nouveaux tests de sensibilité aux antifongiques pour les dermatophytes ont dû être développés. En effet, vu le nombre de patients immunodéprimés en constante augmentation et étant donné le développement de résistances à la trb observée récemment en Inde, il a semblé nécessaire d'établir des procédures de références pour tester la sensibilité des dermatophytes *in vitro* (110). Concernant le dermacheck, celle-ci a été adaptée d'une méthode initialement décrite par Yamada et son équipe (95). Dans l'ensemble, les résultats obtenus avec la méthode dermacheck corrélait en tout point avec la méthode de confirmation. Toutes les souches sensibles et résistantes dépistées par le dermacheck ont été confirmées par la méthode EUCAST E.Def.11.0.

La méthode dermacheck offre de multiples avantages, à commencer par sa sensibilité qui atteint 100% (en comparaison avec la méthode de microdilution EUCAST E.Def.11.0), ce qui permet de minimiser l'obtention de résultats faux-négatifs. Un second avantage est la rapidité de la méthode puisque la plaque peut être lue après seulement 4 jours d'incubation (104) contre 7 pour la méthode de microdilution EUCAST E.Def.11.0. De plus, son élaboration est relativement simple et rapide et les plaques possèdent une durée de conservation de 3 mois si elles sont stockées à 4°C. Finalement, son faible coût et sa facilité de préparation / conservation permettent sa mise en œuvre même dans des pays à faibles revenus, particulièrement en Inde où l'épidémie de cas de *T. indotineae* résistant à la terbinafine est observée depuis 2018 (101).

Cependant, ce test a des limites. La première est le manque de précision du dermacheck. En effet, les sauts de concentration sont trop élevés entre chaque puit que pour pouvoir déterminer une CMI exacte et précise d'une souche testée. Le second inconvénient réside dans sa focalisation exclusive sur un unique agent antifongique. Enfin, le troisième inconvénient concerne les contaminations puisqu'aucun agent antimicrobien est ajouté. Ces contaminations nécessitent de réitérer le test,

ce qui se traduit par une perte de temps considérable. L'ajout d'agent antimicrobiens tels que du chloramphénicol et de l'actidione permettrait de résoudre le problème mais augmenterait également sensiblement le coût des plaques.

Une seconde méthode équivalente au test de dépistage rapide, appelée TCAM (*terbinafine-containing agar medium*), initialement décrite par Yamada et son équipe en 2017, a également été utilisée dans différentes études épidémiologiques portant sur des cas de résistance à la trb (95 ; 112 ; 32). Le principe de la méthode TCAM est similaire au dermacheck, et consiste à inoculer des dermatophytes en culture dans une gélose Sabouraud dextrose (SDA) contenant 0,2 µg/ml de terbinafine, où les souches sont considérées comme sensibles si aucune croissance n'est observée. Cependant, deux inconvénients majeurs sont liés à la méthode TCAM, le premier étant l'absence de contrôle positif. Cette lacune suscite des interrogations quant à l'origine de l'absence de croissance observée, qu'il s'agisse de l'effet inhibiteur de la substance testée ou de problèmes potentiels de viabilité des souches. Le second inconvénient concerne la nature du milieu de culture qui influence la croissance fongique comme démontré très récemment par l'équipe de Bidaut. En effet, la composition du milieu SDA n'étant pas imposée, la composition de la gélose SDA peut varier d'un lot à un autre, pouvant conduire à des variations inter-laboratoires contrairement au milieu RPMI recommandé par l'EUCAST dont la composition est bien définie (113).

5.1.2 Méthode de confirmation (EUCAST E.DEF 11.0).

Outre le « screening », une méthode de confirmation est nécessaire afin de confirmer la résistance contre la drogue d'intérêt. Deux méthodes de tests de sensibilité sont principalement utilisées dans le domaine de la microbiologie clinique pour les dermatophytes, à savoir la méthode EUCAST E.Def.11.0 et la méthode M38 CLSI (pour champignons filamenteux, non spécifique des dermatophytes). La détermination de la CMI pour cette étude nationale belge, a été établie en utilisant la méthode de microdilution EUCAST E.Def.11.0. Cette procédure normalisée, assortie d'une lecture automatisée a été mise en place pour répondre à l'émergence rapide de résistance qui reste largement sous-diagnostiquée.

Plusieurs avantages peuvent être conférées à la méthode EUCAST, en particulier la détermination de la CMI ou encore le test simultané de divers antifongiques (à savoir la terbinafine, l'itraconazole, le voriconazole et l'amorolfine) qui sont rajoutés en duplicata afin de proposer des alternatives de traitements plus efficaces et la possibilité de pouvoir suivre dans une seconde mesure l'évolution du profil de résistance (103 ; 120 cf figure 50). Cependant, la préparation des plaques selon la méthode EUCAST E.Def.11.0 est longue et fastidieuse, nécessitant au moins une demi-journée pour l'élaboration d'une série de 50 plaques et nécessite la passage de souches de contrôle de qualité pour s'assurer de leur bonne manufacture.

Le coût par plaque est également plus onéreux comparé au dermacheck puisque 4 antifongiques sont utilisés dans ce contexte. Un troisième inconvénient concerne le temps d'incubation, puisque 7 jours sont nécessaires avant de réaliser la lecture de la plaque (contre 4 pour le dermacheck). Enfin, le laboratoire doit disposer d'outils adéquats (notamment le lecteur de plaques) ainsi que du personnel compétent pouvant préparer les plaques et analyser les résultats. Alors que la méthode CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) prédomine aux États-Unis et dans de nombreuses régions en dehors de l'Europe, la méthode EUCAST est privilégiée en Europe. Certains pays hors de l'Europe commencent petit à petit

à adopter la méthode EUCAST notamment l’Australie (121). Des différences substantielles entre la méthode EUCAST et la méthode CLSI M38 empêchent une comparaison complète des résultats générés par ces deux techniques. En effet, contrairement à la méthode CLSI M38 (conçue pour les champignons filamenteux en général), la méthode EUCAST a été spécialement développée pour les dermatophytes. De plus, les conditions d’incubation diffèrent également, avec 25-28°C pour la méthode EUCAST (plus adaptée aux dermatophytes) avec un temps d’incubation standardisé à 5-7j contre 35°C pour la méthode CLSI dont le temps d’incubation n’est pas clairement défini. En outre, l’ajout de chloramphénicol et cycloheximide réduit considérablement le risque de contamination pour la méthode EUCAST contrairement à la méthode CLSI qui n’en prévoit pas. Finalement, la lecture de la CMI₅₀ via la méthode EUCAST permet d’éviter le phénomène de « trailing » / croissance résiduelle, observé pour l’itraconazole via la méthode CLSI avec la lecture de la CMI₉₀ recommandée par le CLSI M38. Il serait dès lors pertinent de généraliser une méthode commune pour tous les laboratoires afin de garantir l’harmonisation des pratiques et la comparabilité des résultats obtenus quel que soit le pays considéré (122).

5.1.3 Fréquence des souches *T. indotineae* résistantes à la terbinafine.

Par ces méthodes, sur les 108 souches traitées dans le cadre de cette étude nationale belge, la majorité soit 98,15% ont été définies comme sensibles à la terbinafine. Ce qui signifie une fréquence de 1,85% de cas de résistance à la trb en Belgique, au cours de l’année 2022/2023. Il est à noter que ce taux est provisoire car l’entièreté des souches récoltées au cours de l’étude n’ont pas encore été caractérisées pour leur résistance à la terbinafine. Le taux de résistance de *T. indotineae* à la trb devrait augmenter dans les prochaines années car il fut probablement limité en raison des restrictions de mouvement (particulièrement en Inde) suite à la crise sanitaire mondiale et des mesures d’hygiène renforcées (lavage régulier des mains, contacts physiques restreint, ...) durant la pandémie de COVID-19.

La fréquence du taux de résistance varie selon les régions, comme le montrent les études épidémiologiques. En Inde, le taux de résistance à la terbinafine dans les isolats de *T. indotineae* (CMI $\geq 0,2$ µg/mL) explose, atteignant environ 75 % au niveau national (particulièrement dans le nord de l’Inde) selon l’étude réalisée par Ebert et son équipe incluant 402 patients, même si ce taux est nettement inférieur dans le sud du pays (Chennai) avec un taux de résistance évalué à 16% (32). Ce niveau particulièrement élevé en Inde n’est pas anodin au vu du nombre de cas élevés de dermatophytoses induites par les espèces de la série *T. mentagrophytes*. De plus, des cas de résistances en dehors de l’Inde sont de plus en plus fréquemment rapportés tant par des pays voisins de l’Inde que par des pays éloignés, avec une propagation progressive vers l’Europe ou encore les Etats-Unis depuis 2017-2018. L’apparition de résistances à travers le monde semble principalement causée par les voyages et/ou migration depuis l’Asie du sud (114 ; 20).

Par exemple, en Iran, où *T. indotineae* semble être endémique, une étude épidémiologique réalisée à travers le pays entre 2017 et 2019 (avec un total de 141 souches) a révélé que 18% (soit 5 sur 28) des souches ont été caractérisées comme *T. indotineae*. Le taux de résistance au sein d’une population de dermatophytes a été évalué à 3,5% lorsque toutes les espèces sont prises en compte avec 5 dermatophytes résistants à la trb (tous des *T. indotineae*) sur 141. (115). La Chine, pays frontalier de l’Inde, n’est pas épargnée puisqu’une étude longitudinale reprenant les cas de teignes dû aux espèces de la

série *T. mentagrophytes* entre 2017 et 2022, a rapporté une fréquence de 6,4% de souches résistantes caractérisées comme *T. indotineae* (2 sur 31), isolées sur des étudiants indiens n'ayant pas quitté le pays durant au moins 3 ans (116). Des cas de résistances ont également été signalées en Grèce par l'équipe de Siopi, ayant rapportée une fréquence de 8% (9/112) de souches résistantes, identifiées comme *T. indotineae* au travers d'une étude longitudinale de 10 ans (117). En Allemagne, une étude longitudinale (2016-2020) menée par Nenoff et son équipe ciblant l'espèce *T. indotineae* (anciennement *T. mentagrophytes* VIII), a reporté une fréquence de 45% (13/29 souches) de souches résistantes au sein de cette espèce (118). En France, une récente étude longitudinale (01/2018 au 12/2019) portant sur 2282 patients dont 350 positifs pour une espèce de la série *T. mentagrophytes*, a établi une fréquence de 2% de cas de résistance à la trb (119), un taux assez similaire à celui observé au cours de notre étude. Cependant, il convient d'être prudent lors de la comparaison de la fréquence de résistance à la trb, étant donné que le nombre d'échantillons varie considérablement d'une étude à l'autre. Tandis que certaines études ont été réalisées à large échelle en ciblant diverses espèces, notamment l'équipe de Dellièrre avec 2282 échantillons, d'autres ciblant spécifiquement une espèce d'intérêt, telle que *T. indotineae*, comme celle réalisée par l'équipe de Jia ou Nenoff, comportant par conséquent peu d'échantillons, à savoir 31 et 29 respectivement et présentent plutôt le taux de souches résistantes au sein d'une espèce donnée et pas au sein d'une population définie de dermatophytes circulants.

5.2 Analyses bioinformatiques

Le séquençage génomique est essentiel pour l'identification précise des dermatophytes et la détection de variations génétiques. Il permet de classer les espèces similaires ou distinctes, ainsi que de rechercher des mutations de résistance aux antifongiques. Dans cette étude, trois approches ont été utilisées pour distinguer les espèces de la série *T. mentagrophytes* : l'analyse du génome entier (WGS) pour créer un **dendrogramme de référence**, afin de le comparer au dendrogramme basé sur l'utilisation du gène Efl-alpha et de l'ITS2 (123 ; 124). En ce qui concerne le Maldi-Tof, celui-ci n'est pas utilisé en raison de son imprécision manifeste dans la discrimination de *T. mentagrophytes*/*T. interdigitale* (et même *T. tonsurans*). Toutefois, le Maldi-Tof a été démontré comme permettant la distinction de *T. indotineae* par rapport à *T. interdigitale*/*mentagrophytes* par l'apparition de pics spécifiques de l'espèce (cf figure 26). A noter toutefois que le pic distinctif pour cette espèce n'apparaît qu'après une culture de 7 à 10 jours. Bien que cela puisse être considéré comme une alternative, le CNR a opté pour l'approche de séquençage Efl-alpha afin d'obtenir une différenciation plus précise. En effet, cette approche est privilégiée d'autant plus que la pratique révèle une prévalence importante de *T. interdigitale*, et le séquençage permet de réduire les erreurs de classification contrairement au Maldi-Tof qui ne différencie pas *T. interdigitale* de *T. mentagrophytes* (21).

5.3 Whole Genome Sequencing (WGS)

Le séquençage complet des dermatophytes a été réalisé par du séquençage Illumina Novaseq 6000. Le CNRLM sous-traite le séquençage NGS à la plateforme GIGA Genomics également situé au sein du CHU de Liège. La faculté de l'appareil

Illumina à pouvoir séquencer l'intégralité du génome en fait un atout de taille puisqu'une infinité de paramètres peuvent être explorés comparé au séquençage Sanger ou un seul gène à la fois est séquencé. De plus, les informations du WGS peuvent être stockées indéfiniment, permettant des analyses ultérieures sur d'autres cibles sans dégradation de la séquence. En effet, les souches de dermatophytes étant cryopréservées à -80°C, les cycles de congélation/décongélation peuvent affecter la viabilité ou encore altérer l'ADN (125). Le recours au WGS peut être envisageable lorsque des espèces sont proches tant génétiquement que phénotypiquement parlant, puisque le séquençage WGS prend en considération toutes les variations génétiques présentes dans l'ensemble du génome permettant une meilleure discrimination. C'est la raison pour laquelle l'arbre appelé WGSTr (*Whole genome sequencing tree*) a servi de référence (*gold standard*) lors de l'analyse des arbres phylogénétiques (ITS et Efl-alpha) afin d'obtenir une appréciation du pouvoir discriminant des différents arbres. Avant d'obtenir l'arbre WGSTr, un assemblage du génome est nécessaire en téléversant les fichiers R1 et R2 de séquençages Illumina dans l'outil WGST (Hedera 22) qui réalise l'assemblage en seulement 4h en moyenne.

De plus, les fichiers contenant les séquences génomiques peuvent être téléversés sur des plateformes en ligne où n'importe qui peut avoir accès, ce qui permet d'une part de partager facilement les données avec d'autres chercheurs et scientifiques du monde entier et dans un second temps, favorise la collaboration, l'échange d'informations et la possibilité de mener des études comparatives à grande échelle. Il est important de souligner que le recours au séquençage Illumina peut présenter des coûts jusqu'à huit fois supérieurs à ceux du séquençage Sanger et nécessite en pratique (au CNRLM), d'attendre l'accumulation d'un nombre significatif d'échantillons avant de pouvoir soumettre une demande de séquençage à haut débit, ce qui peut prendre plusieurs mois.

Cependant, il faut prendre en considération que le coût d'un WGS diminue dans le temps, puisqu'il était de 1 million de dollars dans les années 2000 pour le séquençage du génome humain et environnant de nos jours / prochainement 200\$ via l'Illumina Novaseq X (126). De plus, le coût d'un WGS peut être largement amorti si plusieurs marqueurs doivent être séquencés à partir du même génome, à l'instar de cette étude qui comporte 18 marqueurs d'intérêts après séquençage Illumina (cf figure 65). Après avoir soumis la demande de séquençage auprès de la plateforme GIGA genomics, il est nécessaire d'attendre une période d'environ un mois et demi (en moyenne) avant de recevoir les résultats. Ce délai s'avère excessivement long dans les situations où une réponse rapide est requise pour un patient, là où un séquençage Sanger permet d'obtenir une réponse le jour suivant le séquençage.

5.4 Arbre phylogénétique ITS

Le gène ITS a été utilisé afin de confirmer la classification de la nouvelle espèce *T. indotineae*, hautement prévalente en Inde (29). Une phylogénie multigénique considérant plusieurs gènes, tels que le gène Efl-alpha, β -fubulin ou encore HMG peut être utilisé afin d'augmenter le pouvoir discriminant mais nécessite des coûts plus élevés (127 ; 128). Un second aspect primordial à considérer est que l'identification moléculaire des dermatophytes se fait via des bases de données publiques (principalement GenBank, NCBI et *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute*), qui ne sont pas systématiquement mises à jour et contiennent par conséquent des erreurs soit au niveau de la séquence en elle-même, soit au niveau de l'identification, biaisant par conséquent les résultats obtenus lors des analyses.

Par exemple, certaines souches néotype déposées comme *T. interdigitale* se sont avérées être identifiées et comme *T. indotineae* par la suite, biaisant ainsi les résultats de recherches (129).

Par ailleurs, ces mêmes observations ont été confirmées lors d'investigations menées en 2022 concernant les espèces de la série *T. mentagrophytes*, soulignant que le biais concernant les bases de données est toujours d'actualité, malgré de nombreuses critiques à ce sujet depuis quelques années (107). Le recours à un séquençage suivi de la génération d'un arbre phylogénétique par maximum de vraisemblance avec des souches de référence bien caractérisées est donc supérieur à l'approche par confrontation de la séquence à une base de données. En ce qui concerne l'arbre ITS2 généré à partir d'un blast des séquences obtenues par séquençage Illumina, la discrimination des espèces *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale* n'était pas parfaite contrairement à *T. indotineae* qui formait un clade distinct, puisque des souches de *T. mentagrophytes* étaient identifiées comme *T. interdigitale* et vice-versa, soulignant le manque de pouvoir discriminant du gène ITS2, comme observé lors de la mise au point de cette étude (107).

5.5 Arbre phylogénétique Efl- α

De la même manière que l'arbre ITS2, des arbres phylogénétiques fondés sur le gène Efl-alpha ont été générés qui tout comme la région ITS, a été décrit comme permettant la discrimination des espèces de la série *T. mentagrophytes* (19 ; 130 ; 118). Ce gène a été privilégié à la région ITS, suite à une récente étude réalisée par Salehi et son équipe ainsi, qui a démontré la capacité du gène Efl- α à fournir une résolution plus élevée et une meilleure discrimination entre les espèces de dermatophytes. (123). De plus, les résultats obtenus par Khalid El Moussaoui lors de la réalisation de son mémoire de Master en Sciences biomédicales défendu en 2022, corroborent ceux de l'équipe de Salehi, où l'auteur conclut que la séquence Efl-alpha est plus discriminante que la séquence ITS2 en ce qui concerne la série *T. mentagrophytes* (107).

Cette étude rejoint également les observations des deux auteurs puisque l'arbre généré à partir du gène Efl-alpha a permis de correctement discriminer la totalité des souches incluses dans l'arbre par comparaison au modèle de référence (WGSTr) et ce, que ce soit avec les données issues du séquençage Sanger et/ou Illumina. De plus, le gène Efl- α étant plus discriminant que la région ITS (complète ITS 1/ITS2) pour les espèces de la série *T. mentagrophytes*, semble aussi posséder un pouvoir plus discriminant pour certains autres clades d'espèces étroitement apparentées telles que *A. vanbreuseghemii*, *T. rubrum*, *T. benhamiae* ou encore *A. otae* (131).

5.6 Identification des espèces

L'identification précise des espèces de dermatophytes est essentielle pour un diagnostic approprié et un traitement efficace des infections fongiques cutanées. L'un des aspects clés de cette identification est de prendre en compte le site de prélèvement de l'échantillon, car les espèces de dermatophytes ont un certain tropisme pour infecter des sites anatomiques spécifiques chez l'humain et l'animal. En effet, il a été démontré dans plusieurs études que l'espèce *T. mentagrophytes sensu stricto* affecte majoritairement des zones du corps autres que les pieds et ongles en induisant de l'inflammation. L'espèce *T.*

indotineae provoque principalement des *tinea corporis*, *cruris* et *faciei* étendues, hautement inflammatoires et difficiles à traiter et finalement *T. interdigitale* est principalement isolé à partir des *tinea unguium* et *pedis*. Cependant, ce schéma infectieux selon le degré d'inflammation et de la localisation n'est pas toujours observé de manière absolue. En effet, des variations et des exceptions ont été signalées dans diverses études, tels que des infections à *T. mentagrophytes sensu stricto* affectant les pieds, ongles et/ou le corps sans induire d'inflammation (ou très minime), ou encore *T. interdigitale* isolé à partir de *tinea corporis* (128 ; 132 ; 133). Ces mêmes observations ont été constatées lors de cette étude, où *T. interdigitale* était à plus de 90% isolé à partir de *tinea pedis* et *T. mentagrophytes* à plus de 80% à partir d'autres sites que les pieds mais avec des exceptions puisque *T. mentagrophytes* a également été isolé à partir de *tinea pedis* et *T. interdigitale* isolé à partir de *tinea corporis* par exemple. Il est pertinent de souligner l'existence d'une disparité quantitative significative dans le cadre de cette étude, étant donné que l'espèce *T. interdigitale* représente plus de 70% de l'ensemble des échantillons analysés.

Outre la localisation anatomique, d'autres paramètres peuvent être pris en compte afin d'orienter vers le diagnostic/l'agent étiologique. En effet, il est souvent rapporté que les isolats de *T. interdigitale* sont majoritairement d'origine humaine tandis que les isolats de *T. mentagrophytes* sont d'origine animale (134). De même pour *T. indotineae* qui semble majoritairement anthropophile mais a tout de même été isolé à partir de veaux en Égypte, de chiens en Inde et de renards en Pologne (135 ; 136). De plus, une menée par Švarcová a révélé une corrélation significative entre l'âge des patients et leur susceptibilité à développer une forme spécifique de teigne. En effet, lors de l'étude de Švarcová, les patients infectés par *T. mentagrophytes* présentaient une moyenne d'âge de 27 ans, tandis que ceux infectés par *T. interdigitale* avaient un âge moyen de 57 ans.

Ces mêmes observations ont été constatées lors de cette étude, où *T. mentagrophytes* et *T. interdigitale* étaient isolés sur des patients ayant une moyenne d'âge de 31,67 ans, et 49,68 ans respectivement (cf figure 80 ; 81), *T. mentagrophytes* infectant donc préférentiellement le sujet plus jeune. Ces résultats concordent avec les conclusions de Švarcová, ce qui renforce l'idée d'une corrélation entre l'âge des patients et l'agent étiologique de l'infection cutanée. De plus, l'étude menée par Švarcová et la présente étude n'ont pas mis en évidence d'association significative entre le sexe des patients et l'agent étiologique de l'infection cutanée. Enfin, tout comme la présente étude, les études de Švarcová et d'El Moussaoui ont révélé que les souches présentant une mutation K276N du gène SQLE étaient spécifiquement associées à l'espèce *T. mentagrophytes sensu stricto* (128 ; 107). Bien que cette mutation ne soit pas suffisante pour expliquer à elle seule une éventuelle résistance à la trb, étant donné qu'elle est présente chez des espèces résistantes et sensibles (119), elle peut néanmoins orienter (à l'avenir) vers l'espèce responsable de l'infection si cette observation est confirmée par des études ultérieures.



Conclusions & perspectives

6. Conclusions & perspectives

6.1 Conclusions

Cette étude a permis de concrétiser et valider l'approche développée lors d'un mémoire précédent par El Moussaoui K, qui consiste à générer un arbre phylogénétique à partir des données obtenues par le séquençage Sanger du gène *Ef1-alpha* (E1 107). Cet arbre permet *in fine* de discriminer les dermatophytes de la série *T. mentagrophytes* à partir d'échantillons prélevés sur des patients dans le cadre des pratiques habituelles. L'approche consistant en la production d'un arbre phylogénétique après séquençage Sanger du gène *Ef1- α* est suffisamment efficace et pertinente que pour être utilisée en routine puisque 100% des souches ont été identifiées correctement après comparaison au WGStr. Cette méthode présente l'avantage d'être simple, présente un coût raisonnable et peut être directement être utilisée puisque le séquençage Sanger est déjà implémenté depuis plusieurs années au sein du CNRLM. Finalement, l'obtention de résultats est assez rapide, permettant une utilisation quotidienne dans le cadre de l'identification des espèces en routine.

En plus de permettre la discrimination des espèces de la série *T. mentagrophytes*, le profil de résistance des souches peut également être évalué à l'aide du test dermacheck suivi de la confirmation par la méthode EUCAST E.Def 11.0 puisque les résultats obtenus ont montré une sensibilité de 100%, ce qui corrobore les résultats observés dans des études antérieures menées par le CNRLM (104 ; 107). En outre, cette approche offre également l'avantage d'éviter les prescriptions inappropriées d'antifongiques, ce qui contribue à la lutte contre l'émergence de la résistance aux antimycosiques. D'autre part, cette approche autorise le suivi épidémiologique des tendances des dermatophytes, permettant d'identifier les espèces émergentes, en particulier *T. indotineae*, présente en Europe et notamment en Belgique. Cette surveillance épidémiologique est cruciale pour comprendre la prévalence et la distribution des espèces de la série *T. mentagrophytes* à l'échelle mondiale et permet de prendre les mesures de prévention adéquates si nécessaire. Il est crucial de sensibiliser les professionnels de la santé à *T. indotineae* et à sa résistance accrue aux antifongiques afin d'assurer une gestion efficace des infections dermatophytiques.

6.1 Perspectives

Cette approche prometteuse ouvre la voie à de nombreuses possibilités dans le domaine de la recherche et de la pratique clinique. Tout d'abord, l'utilisation du séquençage Sanger du gène *Ef1-alpha* peut être étendue à d'autres espèces de dermatophytes, permettant ainsi une discrimination précise pour un éventail plus large d'infections fongiques, ce qui peut contribuer à l'amélioration de la gestion des infections dermatophytiques. Parallèlement, la surveillance épidémiologique continue des tendances des dermatophytes, en particulier de l'espèce *T. indotineae*, est essentielle pour anticiper et répondre aux éventuelles évolutions de sa résistance et prévalence. Les données recueillies à partir de cette approche peuvent contribuer à une meilleure compréhension des schémas épidémiologiques, à l'identification de nouveaux foyers d'infection et à la mise en place de stratégies de contrôle ciblées. Cela permettrait une meilleure compréhension des mécanismes de transmission et pourrait conduire au développement de mesures préventives plus efficaces.

7. Bibliographie

Références figures

Figure 1 :

Forreter, P. (2015). The universal tree of life: An update. *Frontiers in Microbiology*, 6, 717–717. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00717>

Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jun;87(12):4576-9. doi: 10.1073/pnas.87.12.4576. PMID: 2112744; PMCID: PMC54159.

Figure 2 : Antinori, M.E., Contardi, M., Suarato, G. et al. Advanced mycelium materials as potential self-growing biomedical scaffolds. *Sci Rep* 11, 12630 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91572-x>

Figure 3

Antinori, M.E., Contardi, M., Suarato, G. et al. Advanced mycelium materials as potential self-growing biomedical scaffolds. *Sci Rep* 11, 12630 (2021). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-91572-x>

Garcia-Rubio R, de Oliveira HC, Rivera J, Trevijano-Contador N. The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species. *Front Microbiol*. 2020 Jan 9;10:2993. doi: 10.3389/fmicb.2019.02993. PMID: 31993032; PMCID: PMC6962315.

Figure 4 : Abbaszadeh Hasiri, Mohammad & Derakhshandeh, Abdollah. (2015). Trichophyton mentagrophytes dermatophytosis in a caracal (Caracal caracal). *Online Journal of Veterinary Research*.

Figure 6 : Tang C, Kong X, Ahmed SA, Thakur R, Chowdhary A, Nenoff P, Uhrlass S, Verma SB, Meis JF, Kandemir H, Kang Y, de Hoog GS. Taxonomy of the Trichophyton mentagrophytes/T. interdigitale Species Complex Harboring the Highly Virulent, Multiresistant Genotype T. indotineae. *Mycopathologia*. 2021 Jun;186(3):315-326. doi: 10.1007/s11046-021-00544-2. Epub 2021 Apr 13. PMID: 33847867; PMCID: PMC8249266.

Figure 7 : Kelly BP. Superficial fungal infections. *Pediatr Rev*. 2012 Apr;33(4):e22-37. doi: 10.1542/pir.33-4-e22. PMID: 22474120.

Figure 8 : Jabet A, Normand AC, Brun S, Dannaoui E, Bachmeyer C, Piarroux R, Hennequin C, Moreno-Sabater A. Trichophyton indotineae, from epidemiology to therapeutic. *J Mycol Med*. 2023 Mar 29;33(3):101383. doi: 10.1016/j.mycmed.2023.101383. Epub ahead of print. PMID: 37031652.

Figure 9 & 10 : Moskaluk, A.E.; VandeWoude, S. Current Topics in Dermatophyte Classification and Clinical Diagnosis. *Pathogens* 2022, 11, 957. <https://doi.org/10.3390/pathogens11090957>

Figure 11 : Derry K Mercer, Colin S Stewart, Keratin hydrolysis by dermatophytes, *Medical Mycology*, Volume 57, Issue 1, January 2019, Pages 13–22, <https://doi.org/10.1093/mmy/myx160>

Figure 12 : Hay, R. J., & Baran, R. (2010). Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(6), 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.09.730>

Figure 13 : Soares JJ, Sousa NA, Azulay-Abulafia L, Costa RO. Tinea corporis by *Nannizzia gypsea*: delayed diagnosis due to unusual presentation. *An Bras Dermatol*. 2021;96:91–93.

Leung AK, Lam JM, Leong KF, Hon KL. Tinea corporis: an updated review. *Drugs Context*. 2020 Jul 20;9:2020-5-6. doi: 10.7573/dic.2020-5-6. PMID: 32742295; PMCID: PMC7375854.

Figure 14 : Verma SB, Panda S, Nenoff P, Singal A, Rudramurthy SM, Uhrlass S, Das A, Bisherwal K, Shaw D, Vasani R. The unprecedented epidemic-like scenario of dermatophytosis in India: I. Epidemiology, risk factors and clinical features. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2021 Mar-Apr;87(2):154-175. doi: 10.25259/IJDVL_301_20. PMID: 33769736.

Figure 15 : Chowdhary A, Singh A, Kaur A, Khurana A. The emergence and worldwide spread of the species Trichophyton indotineae causing difficult-to-treat dermatophytosis: A new challenge in the management of dermatophytosis. *PLoS Pathog*. 2022 Sep 29;18(9):e1010795. doi: 10.1371/journal.ppat.1010795. PMID: 36173977; PMCID: PMC9521800.

Uhrlass S, Verma SB, Gräser Y, Rezaei-Matehkolaei A, Hatami M, Schaller M, Nenoff P. *Trichophyton indotineae*—An Emerging Pathogen Causing Recalcitrant Dermatophytoses in India and Worldwide—A Multidimensional Perspective. *J Fungi (Basel)*. 2022 Jul 21;8(7):757. doi: 10.3390/jof8070757. PMID: 35887512; PMCID: PMC9323571.

Dellièrre S, Joannard B, Benderdouche M, Mingui A, Gits-Muselli M, Hamane S, et al. Émergence de Tinea Corporis difficiles à traiter causée par des isolats du complexe Trichophyton mentagrophytes, Paris, France. *Urgence Infect Dis*. 2022;28(1):224-228. <https://doi.org/10.3201/eid2801.210810>

Figure 16 : Aaron, D. M. (2023, May 25). Tinea Pedis (athlete's foot) - dermatologic disorders. MSD Manual Professional Edition. <https://www.msdmanuals.com/professional/dermatologic-disorders/fungal-skin-infections/tinea-pedis-athlete-s-foot>

Figure 17 : Z. Zaidi, K. Hussain and S. Sudhakaran, *Treatment of Skin Diseases A Practical Guide*, Cham:Springer, pp. 463-467, 2019.

Figure 18 : Chabasse, D., & Contet-Audonnet, N. (2013). Les teignes du cuir chevelu. *Revue francophone des laboratoires*, 2013(454), 49–57. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(13\)72131-2](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(13)72131-2)

Tirado-Sánchez, A., Bonifaz, A. Tinea Capitis: Current Review of the Literature. *Curr Fungal Infect Rep* 12, 120–126 (2018). <https://doi.org/10.1007/s12281-018-0320-2>

Peixoto RRGB, Meneses OMS, da Silva FO, Donati A, Veasey JV. Tinea Capitis: Correlation of Clinical Aspects, Findings on Direct Mycological Examination, and Agents Isolated from Fungal Culture. *Int J Trichology*. 2019 Nov-Dec;11(6):232-235. doi: 10.4103/ijt.ijt_88_19. PMID: 32030056; PMCID: PMC6984041.

Figure 19: Chabasse, D., & Contet-Audonnet, N. (2013). Les teignes du cuir chevelu. *Revue francophone des laboratoires*, 2013(454), 49–57. [https://doi.org/10.1016/S1773-035X\(13\)72131-2](https://doi.org/10.1016/S1773-035X(13)72131-2)

Figure 21 : Murat Durdu, Macit Ilkit, Yalda Tamadon, Ali Toloee, Haleh Rafati & Seyedmojtaba Seyedmousavi (2016): Topical and systemic antifungals in dermatology practice, *Expert Review of Clinical Pharmacology*, DOI: 10.1080/17512433.2017.1263564

Pihet M, Le Govic Y. Reappraisal of Conventional Diagnosis for Dermatophytes. *Mycopathologia*. 2017 Feb;182(1-2):169-180. doi: 10.1007/s11046-016-0071-y. Epub 2016 Oct 7. Erratum in: *Mycopathologia*. 2017 Feb;182(1-2):181. PMID: 27718160.

Choi J, Lee Y, Chung HS, Koo JS, Yong D, Kim YS, Lee K, Chong Y. Subcutaneous phaeoophomycosis caused by Phaeoacremonium species in a kidney transplant patient: the first case in Korea. *Korean J Lab Med*. 2011 Jul;31(3):201-4. doi: 10.3343/kjlm.2011.31.3.201. Epub 2011 Jun 28. PMID: 21779196; PMCID: PMC3129353.

Sonthalia S, Singal A, Das S. Tinea cruris and tinea corporis masquerading as tinea incisiviva: case report and review of the literature. *J Cutan Med Surg*. 2014 Oct;18(5):1-6. PMID: 25277164.

Figure 22 : Baumbach CM, Müller S, Reuschel M, Uhrlass S, Nenoff P, Baums CG, Schrödl W. Identification of Zoophilic Dermatophytes Using MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021 Apr 28;11:631681. doi: 10.3389/fcimb.2021.631681. PMID: 33996620; PMCID: PMC8113951.

Pgodoy, P. (2018, September 17). Colonia de Trichophyton Interdigitale. Dr. Patricio Godoy. https://pgodoy.com/?attachment_id=449

Kano R, Kimura U, Kakurai M, Hiruma J, Kamata H, Suga Y, Harada K. Trichophyton indotineae sp. nov.: A New Highly Terbinafine-Resistant Anthropophilic Dermatophyte Species. *Mycopathologia*. 2020 Dec;185(6):947-958. doi: 10.1007/s11046-020-00455-8. Epub 2020 May 24. PMID: 32449054.

Figure 23 : Hardy diagnostics. (n.d.). https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/

Figure 24 : Hoog, G. S. de. (n.d.). Atlas of Clinical Fungi: The ultimate benchmark for diagnostics. introductions, lower fungi, basidiomycetes, yeasts, filamentous Ascomycetes A-B, part 1. Google Books. https://books.google.com/books/about/Atlas_of_Clinical_Fungi.html?id=ZDcyzgEACAAJ

Figure 25 : Torres-Sangiao E, Leal Rodriguez C, García-Riestra C. Application and Perspectives of MALDI-TOF Mass Spectrometry in Clinical Microbiology Laboratories. *Microorganisms*. 2021 Jul 20;9(7):1539. doi: 10.3390/microorganisms9071539. PMID: 34361974; PMCID: PMC8307939.

Figure 26 : Normand, A.-C.; Moreno-Sabater, A.; Jabet, A.; Hamane, S.; Cremer, G.; Foulet, F.; Blaize, M.; Dellière, S.; Bonnal, C.; Imbert, S.; Brun, S.; Packeu, A.; Bretagne, S.; Piarroux, R. MALDI-TOF Mass Spectrometry Online Identification of Trichophyton indotineae Using the MSI-2 Application. *J. Fungi* 2022, 8, 1103. <https://doi.org/10.3390/jof8101103>

Figure 27 : Yoon, H. G., Shin, T. Y., Yu, M. R., Lee, W. W., Ko, S. H., Bae, S. M., ... Woo, S. D. (2013). Characterization of Entomopathogenic Fungus from *Trialeurodes vaporariorum* and Evaluation as Insecticide. *The Korean Journal of Microbiology*, 49(1), 64–70. <https://doi.org/10.7845/KJM.2013.006>

Rezaei-Matehkolaei A, Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Satoh K, Najafzadeh MJ, Shidfar MR. Nucleotide sequence analysis of beta tubulin gene in a wide range of dermatophytes. *Med Mycol*. 2014 Oct;52(7):674-88. doi: 10.1093/mmy/myu033. Epub 2014 Jul 30. PMID: 250792 22.

Garibyan L, Avashia N. Polymerase chain reaction. *J Invest Dermatol*. 2013 Mar;133(3):1-4. doi: 10.1038/jid.2013.1. PMID: 23399825; PMCID: PMC4102308.

E-gel™ power snap electrophoresis device. Thermo Fisher Scientific - US. (n.d.). Retrieved March 13, 2023, from <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/G8100?SID=srch-srp-G8100>

Figure 28 : Orhan, N. (2021, December). St. John's wort hypericum perforatum laboratory guidance document. ResearchGate, from https://www.researchgate.net/publication/357133069_St_John's_Wort_Hypericum_perforatum_Laboratory_Guidance_Document

Figure 29 : Ndiaye M, Sacheli R, Diongue K, Adjetej C, Darfouf R, Seck MC, Badiane AS, Diallo MA, Dieng T, Hayette MP, Ndiaye D. Evaluation of the Multiplex Real-Time PCR DermaGenius® Assay for the Detection of Dermatophytes in Hair Samples from Senegal. *J Fungi (Basel)*. 2021 Dec 24;8(1):11. doi: 10.3390/jof8010011. PMID: 35049951; PMCID: PMC8781194.

Kim J, Lim J, Lee C. Quantitative real-time PCR approaches for microbial community studies in wastewater treatment systems: applications and considerations. *Biotechnol Adv*. 2013 Dec;31(8):1358-73. doi: 10.1016/j.biotechadv.2013.05.010. Epub 2013 Jun 6. PMID: 23747590.

Mészáros, É. (2022, May 11). qPCR: How SYBR® Green and TaqMan® real-time PCR assays work. INTEGRA. <https://www.integra-biosciences.com/japan/en/blog/article/qpcr-how-sybr-green-and-taqman-real-time-pcr-assays-work>

Figure 30 : Singh A, Singh P, Dingemans G, Meis JF, Chowdhary A. Evaluation of DermaGenius® resistance real-time polymerase chain reaction for rapid detection of terbinafine-resistant Trichophyton species. *Mycoses*. 2021 Jul;64(7):721-726. doi: 10.1111/myc.13271. Epub 2021 May 18. PMID: 33760310.

Figure 31 : Dey, P. (2022). Sanger Sequencing and Next Generation Gene Sequencing: Basic Principles and Applications in Pathology. In: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-6616-3_23

Verma M, Kulshrestha S, Puri A. Genome Sequencing. *Methods Mol Biol*. 2017;1525:3-33. doi: 10.1007/978-1-4939-6622-6_1. PMID: 27896715.

Figure 32 : (2021, June 9). Analyzing sanger sequencing data. Analyzing Sanger Sequencing Data | Azenta Life Sciences. Retrieved March 12, 2023, from <https://www.azenta.com/blog/analyzing-sanger-sequencing-data#data-quality-metrics>

Figure 33 : Illumina. Patterned flow cells. 2023. <https://www.illumina.com/science/technology/next-generation-sequencing/sequencing-technology/patterned-flow-cells.html>

Illumina DNA PCR-free prep. Illumina DNA PCR-Free Prep | For sensitive WGS applications. (n.d.). <https://emea.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/dna-pcr-free-prep.html>

Figure 34 : Illumina DNA Prep | Flexibility for many whole-genome sequencing applications. <https://www.illumina.com/products/by-type/sequencing-kits/library-prep-kits/illumina-dna-prep.html>

Figure 35 : Goodwin, S., McPherson, J. & McCombie, W. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet* 17, 333–351 (2016). <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>

Chaitankar V, Karakülah G, Ratnapriya R, Giuste FO, Brooks MJ, Swaroop A. Next generation sequencing technology and genomewide data analysis: Perspectives for retinal research. *Prog Retin Eye Res*. 2016 Nov;55:1-31. doi: 10.1016/j.preteyeres.2016.06.001. Epub 2016 Jun 11. PMID: 27297499; PMCID: PMC5112143.

Figure 36 : ATDBio - Next generation sequencing. (s. d.). <https://atdbio.com/nucleic-acids-book/Next-generation-sequencing>
Illumina. An introduction to Next-Generation Sequencing Technology. 2021. <https://www.illumina.com/technology/next-generation-sequencing.html>

Figure 37 : Johnson, Marc & Carpenter, Eric & Zhijian, Tian & Bruskiwich, Richard & Burris, Jason & Carrigan, Charlotte & Chase, Mark & Clarke, Neil & Covshoff, Sarah & dePamphilis, Claude & Edger, Patrick & Goh, Falcia & Graham, Sean & Greiner, Stephan & Hibberd, Julian & Jordon-Thaden, Ingrid & Kutchan, Toni & Leebens-Mack, Jim & Melkonian, Michael & Wong, Gane. (2012). Evaluating Methods for Isolating Total RNA and Predicting the Success of Sequencing Phylogenetically Diverse Plant Transcriptomes. *PLoS one*. 7. e50226. 10.1371/journal.pone.0050226.

Figure 38 : Johnson, Marc & Carpenter, Eric & Zhijian, Tian & Bruskiwich, Richard & Burris, Jason & Carrigan, Charlotte & Chase, Mark & Clarke, Neil & Covshoff, Sarah & dePamphilis, Claude & Edger, Patrick & Goh, Falcia & Graham, Sean & Greiner, Stephan & Hibberd, Julian & Jordon-Thaden, Ingrid & Kutchan, Toni & Leebens-Mack, Jim & Melkonian, Michael & Wong, Gane. (2012). Evaluating Methods for Isolating Total RNA and Predicting the Success of Sequencing Phylogenetically Diverse Plant Transcriptomes. *PLoS one*. 7. e50226. 10.1371/journal.pone.0050226.

Maurya, I. K., Semwal, R. B., & Semwal, D. K. (2020). Combination therapy against human infections caused by candida species. *Combination Therapy Against Multidrug Resistance*, 81–94. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820576-1.00004-7>

Figure 39 : de Oliveira Santos GC, Vasconcelos CC, Lopes AJO, de Sousa Cartágenes MDS, Filho AKDB, do Nascimento FRF, Ramos RM, Pires ERFB, de Andrade MS, Rocha FMG, de Andrade Monteiro C. Candida Infections and Therapeutic Strategies: Mechanisms of Action for Traditional and Alternative Agents. *Front Microbiol*. 2018 Jul 3;9:1351. doi: 10.3389/fmicb.2018.01351. PMID: 30018595; PMCID: PMC6038711.

Figure 40 : Ivanov, M.; Ćirić, A.; Stojković, D. Emerging Antifungal Targets and Strategies. *Int. J. Mol. Sci*. 2022, 23, 2756. <https://doi.org/10.3390/ijms23052756>

Figure 42 : Teixeira, M.M.; Carvalho, D.T.; Sousa, E.; Pinto, E. New Antifungal Agents with Azole Moieties. *Pharmaceuticals* 2022, 15, 1427. <https://doi.org/10.3390/ph15111427>

Figure 43 : Jachak GR, Ramesh R, Sant DG, Jorwekar SU, Jadhav MR, Tupe SG, Deshpande MV, Reddy DS. Silicon Incorporated Morpholine Antifungals: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *ACS Med Chem Lett*. 2015 Sep 22;6(11):1111-6. doi: 10.1021/acsmchemlett.5b00245. PMID: 26617963; PMCID: PMC4645241.

Figure 44 : Sacheli R, Hayette MP. Antifungal Resistance in Dermatophytes: Genetic Considerations, Clinical Presentations and Alternative Therapies. *J Fungi (Basel)*. 2021 Nov 18;7(11):983. doi: 10.3390/jof7110983. PMID: 34829270; PMCID: PMC8622014.

Figure 45 : Martinez-Rossi NM, Bitencourt TA, Peres NTA, Lang EAS, Gomes EV, Quaresemin NR, Martins MP, Lopes L, Rossi A. Dermatophyte Resistance to Antifungal Drugs: Mechanisms and Prospectus. *Front Microbiol*. 2018 May 29;9:1108. doi: 10.3389/fmicb.2018.01108. PMID: 29896175; PMCID: PMC5986900.

Figure 46 : Sacheli R, Hayette MP. Antifungal Resistance in Dermatophytes: Genetic Considerations, Clinical Presentations and Alternative Therapies. *J Fungi (Basel)*. 2021 Nov 18;7(11):983. doi: 10.3390/jof7110983. PMID: 34829270; PMCID: PMC8622014.

Figure 59 : January 2020 DNeasy UltraClean Microbial Kit Handbook - Qiagen. (n.d.-b). <https://www.qiagen.com/us/resources/download.aspx?id=a733f3a9-5a8b-4003-b28e-55bb050bad1e&lang=en>

Références texte

- Baldau SL, Palmer JD. Animals and fungi are each other's closest relatives: congruent evidence from multiple proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993 Dec 15;90(24):11558-62. doi: 10.1073/pnas.90.24.11558. PMID: 8265589; PMCID: PMC48023.
- Rokas, A. Evolution of the human pathogenic lifestyle in fungi. *Nat Microbiol* 7, 607–619 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41564-022-01112-0>
- Walsh TJ, Dixon DM. Spectrum of Mycoses. In: Baron S, editor. *Medical Microbiology*. 4th ed. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; 1996. Chapter 75. PMID: 21413276.
- Petrucelli MF, Abreu MH, Cantelli BAM, Segura GG, Nishimura FG, Bitencourt TA, Marins M, Fachin AL. Epidemiology and Diagnostic Perspectives of Dermatophytes. *J Fungi (Basel)*. 2020 Nov 23;6(4):310. doi: 10.3390/jof6040310. PMID: 33238603; PMCID: PMC7712040.
- Nzenze-Afene, S., Nguizi-Ogoula, S., Mabicka, B., Matsiegui, P. B., & Blumentrath, C. (2015). Mycoses sous-cutanées : retard au diagnostic et difficultés thérapeutiques : à propos de trois cas diagnostiqués au laboratoire de mycologie de la faculté de médecine de Libreville. *Journal de mycologie médicale*, 25(3), 241–242. <https://doi.org/10.1016/j.mymed.2015.06.059>
- Garcia-Rubio, R., de Oliveira, H. C., Rivera, J., & Trevijano-Contador, N. (2020). The Fungal Cell Wall: Candida, Cryptococcus, and Aspergillus Species. *Frontiers in Microbiology*, 10, 2993–2993. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02993>
- Ruiz-Herrera J, Ortiz-Castellanos L. Cell wall glucans of fungi. A review. *Cell Surf*. 2019 Mar 21;5:100022. doi: 10.1016/j.tcsu.2019.100022. PMID: 32743138; PMCID: PMC7389562.
- Rodrigues ML. The Multifunctional Fungal Ergosterol. *mBio*. 2018 Sep 18;9(5):e01755-18. doi: 10.1128/mBio.01755-18. PMID: 30228244; PMCID: PMC6143734.
- Begum J, Kumar K (2021) Prevalence of dermatophytosis in animals and antifungal susceptibility testing of isolated Trichophyton and Microsporum species. *Trop Anim Health pro* 53:3. <https://doi.org/10.1007/s11250-020-02476-3>
- Martinez-Rossi NM, Peres NTA, Bitencourt TA, Martins MP, Rossi A. State-of-the-Art Dermatophyte Infections: Epidemiology Aspects, Pathophysiology, and Resistance Mechanisms. *J Fungi (Basel)*. 2021 Aug 3;7(8):629. doi: 10.3390/jof7080629. PMID: 34436168; PMCID: PMC8401872.
- Benedict K, Whitham HK, Jackson BR. Economic Burden of Fungal Diseases in the United States. *Open Forum Infect Dis*. 2022 Mar 23;9(4):ofac097. doi: 10.1093/ofid/ofac097. PMID: 35350173; PMCID: PMC8946773.
- Rouzaud C, Hay R, Chosidow O, Dupin N, Puel A, Lortholary O, Lantermier F. Severe Dermatophytosis and Acquired or Innate Immunodeficiency: A Review. *J Fungi (Basel)*. 2015 Dec 31;2(1):4. doi: 10.3390/jof2010004. PMID: 29376922; PMCID: PMC5753085.
- Anne-Laure Charlent. Le complexe Trichophyton dermatophytes, caractérisation moléculaire et moléculaire d'un nouveau variant : Trichophyton mentagrophytes var. porcellae. *Sciences pharmaceutiques*. 2011. fhal-01739135f
- Monod M, Fratti M, Mignon B, Baudraz-Rosset F. Dermatophytes transmis par les animaux domestiques [Dermatophytes transmitted by pets and cattle]. *Rev Med Suisse*. 2014 Apr 2;10(424):749-53. French. PMID: 24772808.
- Degreef H. Clinical forms of dermatophytosis (ringworm infection). *Mycopathologia*. 2008 Nov-Dec;166(5-6):257-65. doi: 10.1007/s11046-008-9101-8. Epub 2008 May 14. PMID: 18478364.
- Sabouraud R. *Les teignes*. Paris: Masson; 1910. p. 106-9.
- Negrini, R. (2010). Historical aspects of dermatomycoses. *Clinics in Dermatology*, 28(2), 125–132. <https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2009.12.010>
- de Hoog GS, Dukik K, Monod M, Packer A, Stubbe D, Hendrickx M, Kupsch C, Stielow JB, Freeke J, Güker M, Rezaei-Matehkolaei A, Mihendi H, Gräser Y. Toward a Novel Multilocus Phylogenetic Taxonomy for the Dermatophytes. *Mycopathologia*. 2017 Feb;182(1-2):5-31. doi: 10.1007/s11046-016-0073-9. Epub 2016 Oct 25. PMID: 27783317; PMCID: PMC5283515.
- Tang C, Kong X, Ahmed SA, Thakur R, Chowdhary A, Nenoff P, Uhrlass S, Verma SB, Meis JF, Kandemir H, Kang Y, de Hoog GS. Taxonomy of the Trichophyton mentagrophytes/T. interdigitale Species Complex Harboring the Highly Virulent, Multiresistant Genotype T. indoneae. *Mycopathologia*. 2021 Jun;186(3):315-326. doi: 10.1007/s11046-021-00544-2. Epub 2021 Apr 13. PMID: 33847867; PMCID: PMC8249266.
- Kano R, Kimura U, Kakurai M, Hiruma J, Kamata H, Suga Y, Harada K. *Trichophyton indoneae* sp. nov.: A New Highly Terbinafine-Resistant Anthropophilic Dermatophyte Species. *Mycopathologia*. 2020 Dec;185(6):947-958. doi: 10.1007/s11046-020-00455-8. Epub 2020 May 24. PMID: 32449054.
- Normand, A.-C.; Moreno-Sabater, A.; Jabet, A.; Hamane, S.; Cremer, G.; Foulet, F.; Blaize, M.; Dellière, S.; Bonnal, C.; Imbert, S.; Brun, S.; Packer, A.; Bretagne, S.; Piaroux, R. MALDI-TOF Mass Spectrometry Online Identification of Trichophyton indoneae Using the MSI-2 Application. *J Fungi* 2022, 8, 1103. <https://doi.org/10.3390/jof8111103>
- Havlickova, B., Czaika, V. A., & Friedrich, M. (2008). Epidemiological trends in skin mycoses worldwide. *Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*, 51(64), 2–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2008.01606.x>
- Ameen M. Epidemiology of superficial fungal infections. *Clin Dermatol*. 2010 Mar 4;28(2):197-201. doi: 10.1016/j.clindermatol.2009.12.005. PMID: 20347663.
- Oumar Coulibaly, Coralie L'Ollivier, Renaud Piaroux, Stéphane Ranque, Epidemiology of human dermatophytoses in Africa. *Medical Mycology*, Volume 56, Issue 2, February 2018, Pages 145–161, <https://doi.org/10.1093/mmy/myx048>
- Seebacher, C., Bouchara, JP., & Mignon, B. Updates on the Epidemiology of Dermatophyte Infections. *Mycopathologia* 166, 335–352 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9100-9>
- Verma SB, Madhu R. The Great Indian Epidemic of Superficial Dermatophytosis: An Appraisal. *Indian J Dermatol*. 2017 May-Jun;62(3):227-236. doi: 10.4103/ijid.IJD_206_17. PMID: 28584364; PMCID: PMC5448256.
- Verma SB. Sales, status, prescriptions and regulatory problems with topical steroids in India. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2014 May-Jun;80(3):201-3. doi: 10.4103/0378-6323.132246. PMID: 24823396.
- Uhrlass S, Verma SB, Gräser Y, Rezaei-Matehkolaei A, Hatami M, Schaller M, Nenoff P. *Trichophyton indoneae*-An Emerging Pathogen Causing Recalcitrant Dermatophytoses in India and Worldwide-A Multidimensional Perspective. *J Fungi (Basel)*. 2022 Jul 21;8(7):757. doi: 10.3390/jof8070757. PMID: 35887512; PMCID: PMC9323571.
- Nenoff P, Verma SB, Vasani R, Burmester A, Hipler UC, Wittig F, Krüger C, Nenoff K, Wiegand C, Saraswat A, Madhu R, Panda S, Das A, Kura M, Jain A, Koch D, Köhler Y, Uhrlass S. The current Indian epidemic of superficial dermatophytosis due to Trichophyton mentagrophytes-A molecular study. *Mycoses*. 2019 Apr;62(4):336-356. doi: 10.1111/myc.12878. Epub 2019 Feb 20. PMID: 30561859.
- Dogra, Sunil; Upreti, Shradha. The menace of chronic and recurrent dermatophytosis in India: Is the problem deeper than we perceive?. *Indian Dermatology Online Journal* 7(2):p 73-76, Mar-Apr 2016. | DOI: 10.4103/2229-5178.178100
- Khurana A, Masih A, Chowdhary A, Sardana K, Borker S, Gupta A, Gautam RK, Sharma PK, Jain D. Correlation of In Vitro Susceptibility Based on MICs and Squalene Epoxidase Mutations with Clinical Response to Terbinafine in Patients with Tinea Corporis/Cruris. *Antimicrob Agents Chemother*. 2018 Nov 26;62(12):e01038-18. doi: 10.1128/AAC.01038-18. PMID: 30275090; PMCID: PMC6256768.
- Ebert A, Monod M, Salamin K, Burmester A, Uhrlass S, Wiegand C, Hipler UC, Krüger C, Koch D, Wittig F, Verma SB, Singal A, Gupta S, Vasani R, Saraswat A, Madhu R, Panda S, Das A, Kura MM, Kumar A, Poojary S, Schirm S, Gräser Y, Paasch U, Nenoff P. Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study. *Mycoses*. 2020 Jul;63(7):717-728. doi: 10.1111/myc.13091. Epub 2020 May 4. PMID: 32301159. Ebert A, Monod M, Salamin K, Burmester A, Uhrlass S, Wiegand C, Hipler UC, Krüger C, Koch D, Wittig F, Verma SB, Singal A, Gupta S, Vasani R, Saraswat A, Madhu R, Panda S, Das A, Kura MM, Kumar A, Poojary S, Schirm S, Gräser Y, Paasch U, Nenoff P. Alarming India-wide phenomenon of antifungal resistance in dermatophytes: A multicentre study. *Mycoses*. 2020 Jul;63(7):717-728. doi: 10.1111/myc.13091. Epub 2020 May 4. PMID: 32301159.
- Sacheli R, Cuyppers L, Seidel L, Darfouf R, Adjety C, Lagrou K, Hayette MP. Epidemiology of Dermatophytes in Belgium: A 5 Years' Survey. *Mycopathologia*. 2021 Jun;186(3):399-409. doi: 10.1007/s11046-021-00542-4. Epub 2021 Apr 26. Erratum in: *Mycopathologia*. 2021 Dec;186(6):897. PMID: 33900539.
- Achterman RR, White TC. Dermatophyte virulence factors: identifying and analyzing genes that may contribute to chronic or acute skin infections. *Int J Microbiol*. 2012;2012:358305. doi: 10.1155/2012/358305. Epub 2011 Oct 4. PMID: 21977036; PMCID: PMC3185252.
- Sardana K, Gupta A, Mathachan SR. Immunopathogenesis of Dermatophytoses and Factors Leading to Recalcitrant Infections. *Indian Dermatol Online J*. 2021 May 12;12(3):389-399. doi: 10.4103/idoj.IDOJ_503_20. PMID: 34211904; PMCID: PMC8202482.
- Monod M. Secreted proteases from dermatophytes. *Mycopathologia*. 2008 Nov-Dec;166(5-6):285-94. doi: 10.1007/s11046-008-9105-4. Epub 2008 May 14. PMID: 18478360.
- Gil Kaufman, Benjamin A. Horwitz, Lea Duek, Yehuda Ullman, Israela Berdicevsky. Infection stages of the dermatophyte pathogen Trichophyton: microscopic characterization and proteolytic enzymes, *Medical Mycology*, Volume 45, Issue 2, March 2007, Pages 149–155, <https://doi.org/10.1080/13693780601113618>
- Bongomin F, Batac CR, Richardson MD, Denning DW. A Review of Onychomycosis Due to Aspergillus Species. *Mycopathologia*. 2018 Jun;183(3):485-493. doi: 10.1007/s11046-017-0222-9. Epub 2017 Nov 16. PMID: 29147866; PMCID: PMC5958150.
- Rather S, Keen A, Shah FY, Yaseen A, Farooq S, Bakshi A. Candidal Onychomycosis: Clinicopathological Profile, Prevaling Strains, and Antifungal Susceptibility Pattern-A Study from a Tertiary Care Hospital. *Indian J Dermatol*. 2021 Mar-Apr;66(2):132-137. doi: 10.4103/ijid.IJD_395_20. PMID: 34188267; PMCID: PMC8208255.
- Gupta AK, Taborda VBA, Taborda PRO, Shemer A, Summerbell RC, Nakrieko KA. High prevalence of mixed infections in global onychomycosis. *PLoS One*. 2020 Sep 29;15(9):e0239648. doi: 10.1371/journal.pone.0239648. PMID: 32991597; PMCID: PMC7523972.
- Hay, R. J., & Baran, R. (2010). Onychomycosis: A proposed revision of the clinical classification. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 65(6), 1219–1227. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2010.09.730>
- Kelly BP. Superficial fungal infections. *Pediatr Rev*. 2012 Apr;33(4):e22-37. doi: 10.1542/pir.33-4-e22. PMID: 22474120.
- Yin B, Xiao Y, Ran Y, Kang D, Dai Y, Lama J. Microsporum canis infection in three familial cases with tinea capitis and tinea corporis. *Mycopathologia*. 2013 Oct;176(3-4):259-65. doi: 10.1007/s11046-013-9685-5. Epub 2013 Aug 6. PMID: 23918090.
- Leung AK, Lam JM, Leong KF, Hon KL. Tinea corporis: an updated review. *Drugs Context*. 2020 Jul 20;9:2020-5-6. doi: 10.7573/dic.2020-5-6. PMID: 32742295; PMCID: PMC7375854.
- Chowdhary A, Singh A, Kaur A, Khurana A. The emergence and worldwide spread of the species Trichophyton indoneae causing difficult-to-treat dermatophytosis: A new challenge in the management of dermatophytosis. *PLoS Pathog*. 2022 Sep 29;18(9):e1010795. doi: 10.1371/journal.ppat.1010795. PMID: 36173977; PMCID: PMC9521800.
- Nigam PK, Saleh D. Tinea Pedis. [Updated 2022 Jul 3]. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470421/>
- Greywal, T., & Friedlander, S. F. (2018). Dermatophytes and Other Superficial Fungi. In *Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases* (pp. 1282-1287.e2). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-40181-4.00254-1>
- Al About AM, Crane JS. Tinea Capitis. [Updated 2022 Aug 8]. In: *StatPearls [Internet]*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022 Jan-. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK536909/>
- Chabasse, D., & Contet-Audonou, N. (2013). Les teignes du cuir chevelu. *Revue francophone des laboratoires*, 2013(454), 49–57. [https://doi.org/10.1016/S11773-035X\(13\)72131-2](https://doi.org/10.1016/S11773-035X(13)72131-2)
- Hayette MP, Seidel L, Adjety C, Darfouf R, Wéry M, Boreux R, Sacheli R, Melin P, Arrese J. Clinical evaluation of the DermaGenius® Nail real-time PCR assay for the detection of dermatophytes and Candida albicans in nails. *Med Mycol*. 2019 Apr 1;57(3):277-283. doi: 10.1093/mmy/myy020. PMID: 29762721.
- Robert, R., Pihet, M. Conventional Methods for the Diagnosis of Dermatophytosis. *Mycopathologia* 166, 295–306 (2008). <https://doi.org/10.1007/s11046-008-9106-3>
- KOH – Pas – calcafluor : Philippe, D. (n.d.). Identification des champignons d'importance médicale - INSPQ. Retrieved March 2021, from https://mobile.inspq.qc.ca/sites/default/files/lspq/identification_champignons_importance_medicale.pdf
- Panasiti V, Borroni RG, Devirgiliis V, Rossi M, Fabbrizio L, Mascangelo R, et al. Comparison of diagnostic methods in the diagnosis of dermatomycoses and onychomycoses. *Mycoses* 2006;49:26-9.

- 54) Pihet M, Le Govic Y. Reappraisal of Conventional Diagnosis for Dermatophytes. *Mycopathologia*. 2017 Feb;182(1-2):169-180. doi: 10.1007/s11046-016-0071-y. Epub 2016 Oct 7. Erratum in: *Mycopathologia*. 2017 Feb;182(1-2):181. PMID: 27718160.
- 55) Sebastian Gnat, Aneta Nowakiewicz, Dominik Łagowski, Aleksandra Trościańczyk, Przemysław Zięba, Multiple-strain Trichophyton mentagrophytes infection in a silver fox (Vulpes vulpes) from a breeding farm, *Medical Mycology*, Volume 57, Issue 2, February 2019, Pages 171–180, <https://doi.org/10.1093/mmy/my11>
- 56) Verrier, J., Monod, M. Diagnostic de la dermatophytose à l'aide de la biologie moléculaire. *Mycopathologie* 182 , 193-202 (2017). <https://doi.org/10.1007/s11046-016-0038-z>
- 57) Kliem M, Sauer S. The essence on mass spectrometry based microbial diagnostics. *Curr Opin Microbiol*. 2012 Jun;15(3):397-402. doi: 10.1016/j.mib.2012.02.006. Epub 2012 Mar 10. PMID: 22410108.
- 58) Van den Boom D, Wjst M, Everts RE. MALDI-TOF mass spectrometry. *Methods Mol Biol*. 2013;1015:71-85. doi: 10.1007/978-1-62703-435-7_4. PMID: 23824849.
- 59) Singhal N, Kumar M, Kanaujia PK, Viridi JS. MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. *Front Microbiol*. 2015 Aug 5;6:791. doi: 10.3389/fmicb.2015.00791. PMID: 26300860; PMCID: PMC4525378.
- 60) Azrad, M., Freidus, V., Kassem, R., & Peretz, A. (2019). Identification of dermatophytes by MALDI-TOF MS technology in the clinical laboratory. *International Journal of Mass Spectrometry*, 440, 32–36. <https://doi.org/10.1016/j.ijms.2019.03.005>
- 61) Coralie L'Ollivier, Carole Cassagne, Anne-Cécile Normand, Jean-Philippe Bouchara, Nelly Contet-Audouonne, Marijke Hendrickx, Patrick Fourquet, Omar Coulibaly, Renaud Piarroux, Stéphane Ranque, A MALDI-TOF MS procedure for clinical dermatophyte species identification in the routine laboratory, *Medical Mycology*, Volume 51, Issue 7, October 2013, Pages 713–720, <https://doi.org/10.3109/13693786.2013.781691>
- 62) Sung-Oui Suh, Kendra M. Grosso & Miguel E. Carrion (2018) Multilocus phylogeny of the Trichophyton mentagrophytes species complex and the application of matrix-assisted laser desorption/ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for the rapid identification of dermatophytes, *Mycologia*, 110:1, 118-130, DOI: 10.1080/00275514.2018.1443653
- 63) Mehta, N., Jadhav, R., Baghela, A. (2022). Molecular Taxonomy and Multigene Phylogeny of Filamentous Fungi. In: Gupta, V.K., Tuohy, M. (eds) *Laboratory Protocols in Fungal Biology*. Fungal Biology. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-030-83749-5_10
- 64) Kano R, Noguchi H, Harada K, Hiruma M. Rapid Molecular Detection of Terbinafine-resistant Dermatophytes. *Med Mycol J*. 2021;62(2):41-44. doi: 10.3314/mmj.21-00001. PMID: 34053979.
- 65) Bagyalakshmi R, Senthilvelan B, Therese KL, Murugusundram S, Madhavan HN. Application of polymerase chain reaction (PCR) and PCR based restriction fragment length polymorphism for detection and identification of dermatophytes from dermatological specimens. *Indian J Dermatol*. 2008 Jan;53(1):15-20. doi: 10.4103/0019-5154.39735. PMID: 19967012; PMCID: PMC2784578.
- 66) Batvandi A, Pchelini IM, Kiasat N, Kharazi M, Mohammadi R, Zomorodian K, Rezaei-Matehkolaei A. Time and cost-efficient identification of Trichophyton indotineae. *Mycoses*. 2023 Jan;66(1):75-81. doi: 10.1111/myc.13530. Epub 2022 Sep 22. PMID: 36114817.
- 67) Rezaei-Matehkolaei A, Makimura K, De Hoog GS, Shidfar MR, Satoh K, Najafzadeh MJ, Mirhendi H. Discrimination of Trichophyton tonsurans and Trichophyton equinum by PCR-RFLP and by β -tubulin and translation elongation factor 1- α sequencing. *Med Mycol*. 2012 Oct;50(7):760-4. doi: 10.3109/13693786.2012.661885. Epub 2012 Feb 28. PMID: 22369622.
- 68) Li HC, Bouchara JP, Hsu MM, Barton R, Su S, Chang TC. Identification of dermatophytes by sequence analysis of the rRNA gene internal transcribed spacer regions. *J Med Microbiol*. 2008 May;57(Pt 5):592-600. doi: 10.1099/jmm.0.47607-0. PMID: 18436592.
- 69) Ndiaye M, Sacheli R, Diongue K, Adjetej C, Darfouf R, Seck MC, Badiane AS, Diallo MA, Dieng T, Hayette MP, Ndiaye D. Evaluation of the Multiplex Real-Time PCR DermaGenius® Assay for the Detection of Dermatophytes in Hair Samples from Senegal. *J Fungi (Basel)*. 2021 Dec 24;8(1):11. doi: 10.3390/jof810011. PMID: 35049951; PMCID: PMC8781194.
- 70) Garg, J., Tiliak, R., Garg, A. et al. Rapid detection of dermatophytes from skin and hair. *BMC Res Notes* 2, 60 (2009). <https://doi.org/10.1186/1756-0500-2-60>
- 71) Sherman, S., Goshen, M., Treigerman, O., Ben-Zion, K., Carp, M.-J., Maisler, N., Ehrenreich, I. B., Kimchi, A., Lifshitz, S., Smollan, G., Davidovici, B., David, M., Hodak, E., & Segal, R. (2018). Evaluation of multiplex real-time PCR for identifying dermatophytes in clinical samples—A multicentre study. *Mycoses: Diagnosis, Therapy and Prophylaxis of Fungal Diseases*, 61(2), 119–126. <https://doi.org/10.1111/myc.12713>
- 72) Dey, P. (2022). *Sanger Sequencing and Next Generation Gene Sequencing: Basic Principles and Applications in Pathology*. In: *Basic and Advanced Laboratory Techniques in Histopathology and Cytology*. Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-19-6616-3_23
- 73) Verma M, Kulshrestha S, Puri A. Genome Sequencing. *Methods Mol Biol*. 2017;1525:3-33. doi: 10.1007/978-1-4939-6622-6_1. PMID: 27896715.
- 74) Hall N. Advanced sequencing technologies and their wider impact in microbiology. *J Exp Biol*. 2007 May;210(Pt 9):1518-25. doi: 10.1242/jeb.001370. PMID: 17449817.
- 75) Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, Clement T, Toohey-Kurth K. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Invest*. 2020 Nov;32(6):767-775. doi: 10.1177/1040638720905833. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32070230; PMCID: PMC7649556.
- 76) Ishige T, Itoya S, Matsushita K. Locked Nucleic Acid Technology for Highly Sensitive Detection of Somatic Mutations in Cancer. *Adv Clin Chem*. 2018;83:53-72. doi: 10.1016/bs.acc.2017.10.002. Epub 2017 Nov 23. PMID: 29304903.
- 77) Pervez MT, Hasnain MJU, Abbas SH, Moustafa MF, Aslam N, Shah SSM. A Comprehensive Review of Performance of Next-Generation Sequencing Platforms. *Biomed Res Int*. 2022 Sep 29;2022:3457806. doi: 10.1155/2022/3457806. PMID: 36212714; PMCID: PMC9537002.
- 78) Zhang L, Chen F, Zeng Z, Xu M, Sun F, Yang L, Bi X, Lin Y, Gao Y, Hao H, Yi W, Li M and Xie Y (2021) Advances in Metagenomics and Its Application in Environmental Microorganisms. *Front. Microbiol.* 12:766364. doi: 10.3389/fmicb.2021.766364
- 79) Xiao T, Zhou W. The third generation sequencing: the advanced approach to genetic diseases. *Transl Pediatr*. 2020 Apr;9(2):163-173. doi: 10.21037/tp.2020.03.06. PMID: 32477917; PMCID: PMC7237973.
- 80) Ari, S., Arikani, M. (2016). Next-Generation Sequencing: Advantages, Disadvantages, and Future. In: Hakeem, K., Tombuloglu, H., Tombuloglu, G. (eds) *Plant Omics: Trends and Applications*. Springer, Cham. https://doi.org/10.1007/978-3-319-31703-8_5
- 81) Gupta AK, Cooper EA. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. *Mycopathologia*. 2008 Nov-Dec;166(5-6):353-67. doi: 10.1007/s11046-008-9109-0. Epub 2008 May 14. PMID: 18478357.
- 82) Sahoo AK, Mahajan R. Management of tinea corporis, tinea cruris, and tinea pedis: A comprehensive review. *Indian Dermatol Online J*. 2016 Mar-Apr;7(2):77-86. doi: 10.4103/2229-5178.178099. PMID: 27057486; PMCID: PMC4804599.
- 83) Jessup CJ, Ryder NS, Ghannoum MA. An evaluation of the in vitro activity of terbinafine. *Med Mycol*. 2000 Apr;38(2):155-9. doi: 10.1080/myc.38.2.155.159. PMID: 10817232.
- 84) U.S. National Library of Medicine. (2018, June). *LiverTox: Clinical and research information on drug-induced liver injury [internet]*. National Center for Biotechnology Information. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31643176/>
- 85) Birnbaum JE. Pharmacology of the allylamines. *J Am Acad Dermatol*. 1990 Oct;23(4 Pt 2):782-5. doi: 10.1016/0190-9622(90)70288-s. PMID: 2229523.
- 86) Singh A, Masih A, Khurana A, Singh PK, Gupta M, Hagen F, Meis JF, Chowdhary A. High terbinafine resistance in Trichophyton interdigitale isolates in Delhi, India harbouring mutations in the squalene epoxidase gene. *Mycoses*. 2018 Jul;61(7):477-484. doi: 10.1111/myc.12772. Epub 2018 Apr 27. PMID: 29577447.
- 87) Wiederhold NP. The antifungal arsenal: alternative drugs and future targets. *Int J Antimicrob Agents*. 2018 Mar;51(3):333-339. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2017.09.002. Epub 2017 Sep 7. PMID: 28890395.
- 88) Vanrepeleen G, Wuyts J, Van Dijk P, Vandercruys P. Sources of Antifungal Drugs. *J Fungi (Basel)*. 2023 Jan 28;9(2):171. doi: 10.3390/jof9020171. PMID: 36836286; PMCID: PMC965926.
- 89) Zaug M, Bergstrasser M. Amorolfine in the treatment of onychomycoses and dermatomycoses (an overview). *Clin Exp Dermatol*. 1992 Sep;17 Suppl 1:61-70. doi: 10.1111/j.1365-2230.1992.tb00281.x. PMID: 1458669.
- 90) Banerjee M, Ghosh AK, Basak S, Das KD, Gangopadhyay DN. Comparative evaluation of effectiveness and safety of topical amorolfine and clotrimazole in the treatment of tinea corporis. *Indian J Dermatol*. 2011 Nov;56(6):657-62. doi: 10.4103/0019-5154.91823. PMID: 22345765; PMCID: PMC3276891.
- 91) Jachak GR, Ramesh R, Sant DG, Jorwekar SU, Jadhav MR, Tupe SG, Deshpande MV, Reddy DS. Silicon Incorporated Morpholine Antifungals: Design, Synthesis, and Biological Evaluation. *ACS Med Chem Lett*. 2015 Sep 22;6(11):1111-6. doi: 10.1021/acsmchemlett.5b00245. PMID: 26617963; PMCID: PMC4645241.
- 92) Mazu TK, Bricker BA, Flores-Rozas H, Abloredepey SY. The Mechanistic Targets of Antifungal Agents: An Overview. *Mini Rev Med Chem*. 2016;16(7):555-78. doi: 10.2174/1389557516666160118112103. PMID: 26776224; PMCID: PMC5215921.
- 93) Baran R, Sigurgeirsson B, de Berker D, Kaufmann R, Lecha M, Faergemann J, Kerrouche N, Sidou F. A multicentre, randomized, controlled study of the efficacy, safety and cost-effectiveness of a combination therapy with amorolfine nail lacquer and oral terbinafine compared with oral terbinafine alone for the treatment of onychomycosis with matrix involvement. *Br J Dermatol*. 2007 Jul;157(1):149-57. doi: 10.1111/j.1365-2133.2007.07974.x. Epub 2007 Jun 6. PMID: 17553051.
- 94) Osborne CS, Leitner I, Favre B, Ryder NS. Amino acid substitution in Trichophyton rubrum squalene epoxidase associated with resistance to terbinafine. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005 Jul;49(7):2840-4. doi: 10.1128/AAC.49.7.2840-2844.2005. PMID: 15980358; PMCID: PMC1168638.
- 95) Yamada T, Maeda M, Alshahni MM, Tanaka R, Yaguchi T, Bontems O, Salamin K, Fratti M, Monod M. Terbinafine Resistance of Trichophyton Clinical Isolates Caused by Specific Point Mutations in the Squalene Epoxidase Gene. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017 Jun 27;61(7):e00115-17. doi: 10.1128/AAC.00115-17. PMID: 28416557; PMCID: PMC5487658.
- 96) Saunte DML, Hare RK, Jørgensen KM, Jørgensen R, Deleuran M, Zachariae CO, Thomsen SF, Bjørnskov-Halkier L, Kofoed K, Arendrup MC. Emerging Terbinafine Resistance in Trichophyton: Clinical Characteristics, Squalene Epoxidase Gene Mutations, and a Reliable EUCAST Method for Detection. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Sep 23;63(10):e01126-19. doi: 10.1128/AAC.01126-19. PMID: 31383665; PMCID: PMC6761549.
- 97) Gawaz A, Nenoff P, Uhrhlaß S, Schaller M. Therapie eines Terbinafin-resistenten Trichophyton mentagrophytes Typ VIII [Treatment of a terbinafine-resistant trichophyton mentagrophytes type VIII]. *Hautartz*. 2021 Oct;72(10):900-904. German. doi: 10.1007/s00105-021-04857-7. Epub 2021 Jul 9. PMID: 34241651.
- 98) Shen JJ, Arendrup MC, Verma S, Saunte DML. The Emerging Terbinafine-Resistant Trichophyton Epidemic: What Is the Role of Antifungal Susceptibility Testing? *Dermatology*. 2022;238(1):60-79. doi: 10.1159/000515290. Epub 2021 May 31. PMID: 34058736.
- 99) Sacheli R, Harag S, Dehavay F, Evrard S, Rousseaux D, Adjetej A, Seidel L, Laffineur K, Lagrou K, Hayette M-P. Belgian National Survey on Tinea Capitis: Epidemiological Considerations and Highlight of Terbinafine-Resistant T. mentagrophytes with a Mutation on SQLE Gene. *J Fungi* 2020, 6, 195. <https://doi.org/10.3390/jof6040195>
- 100) Sacheli R, Harag S, Dehavay F, Evrard S, Rousseaux D, Adjetej A, Seidel L, Laffineur K, Lagrou K, Hayette M-P. Belgian National Survey on Tinea Capitis: Epidemiological Considerations and Highlight of Terbinafine-Resistant T. mentagrophytes with a Mutation on SQLE Gene. *J Fungi* 2020, 6, 195. <https://doi.org/10.3390/jof6040195>
- 101) Singh A, Masih A, Monroy-Nieto J, Singh PK, Bowers J, Travis J, Khurana A, Engelthaler DM, Meis JF, Chowdhary A. A unique multidrug-resistant clonal Trichophyton population distinct from Trichophyton mentagrophytes/Trichophyton interdigitale complex causing an ongoing alarming dermatophytosis outbreak in India: Genomic insights and resistance profile. *Fungal Genet Biol*. 2019 Dec;133:103266. doi: 10.1016/j.fgb.2019.103266. Epub 2019 Sep 3. PMID: 31491507.
- 102) Friedman, D.Z.P.; Schwartz, I.S. Emerging Fungal Infections: New Patients, New Patterns, and New Pathogens. *J Fungi* 2019, 5, 67. <https://doi.org/10.3390/jof5030067>
- 103) Arendrup MC, Kahlmeter G, Guinea J, Meletiadis J; Subcommittee on Antifungal Susceptibility Testing (AFST) of the ESCMID European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). How to perform antifungal susceptibility testing of microconidia-forming dermatophytes following the new reference EUCAST method E.Def 11.0, exemplified by Trichophyton. *Clin Microbiol Infect*. 2021 Jan;27(1):55-60. doi: 10.1016/j.cmi.2020.08.042. Epub 2020 Sep 8. PMID: 32916260.
- 104) Gouters, M. (2022). Caractérisation phénotypique et moléculaire de la résistance des dermatophytes à la terbinafine et évaluation du kit PCR multiplex en temps réel «DermaGenius® Resistance».

- 104) Gouters, M. (2022). Caractérisation phénotypique et moléculaire de la résistance des dermatophytes à la terbinafine et évaluation du kit PCR multiplex en temps réel «DermGenius® Resistance».
- 105) ESCMID - European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases . (2023, January 2). Clinical breakpoints - breakpoints and guidance. EUCAST. Retrieved from https://www.eucast.org/clinical_breakpoints
- 106) Lucena-Aguilar G, Sánchez-López AM, Barberán-Aceituno C, Carrillo-Ávila JA, López-Guerrero JA, Aguilar-Quesada R. DNA Source Selection for Downstream Applications Based on DNA Quality Indicators Analysis. *Biopreserv Biobank*. 2016 Aug;14(4):264-70. doi: 10.1089/bio.2015.0064. Epub 2016 May 9. PMID: 27158753; PMCID: PMC4991598.
- 107) El Moussaoui, K. (2022). Evaluation of high-throughput genome sequencing for molecular typing and distinction of dermatophytes of the Trichophyton mentagrophytes / interdigitale / indotinea complex. Retrieved April 28, 2023, from <https://mathéo.uliege.be/handle/2268.2/14579>
- 108) Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990 Oct 5;215(3):403-10. doi: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2. PMID: 2231712.
- 109) Monod M, Feuermann M, Salamin K, Fratti M, Makino M, Alshahi MM, Makimura K, Yamada T. Trichophyton rubrum Azole Resistance Mediated by a New ABC Transporter, TruMDR3. *Antimicrob Agents Chemother*. 2019 Oct 22;63(11):e00863-19. doi: 10.1128/AAC.00863-19. PMID: 31501141; PMCID: PMC6811443.
- 110) Denning DW. Antifungal drug resistance: an update. *Eur J Hosp Pharm*. 2022 Mar;29(2):109-112. doi: 10.1136/ejpharm-2020-002604. PMID: 35190454; PMCID: PMC8899664.
- 111) Sacheli R, Hayette MP. Antifungal Resistance in Dermatophytes: Genetic Considerations, Clinical Presentations and Alternative Therapies. *J Fungi (Basel)*. 2021 Nov 18;7(11):983. doi: 10.3390/jof7110983. PMID: 34829270; PMCID: PMC8622014.
- 112) Moreno-Sabater A, Normand AC, Bidaud AL, Cremer G, Foulet F, Brun S, Bonnal C, Ait-Ammar N, Jabet A, Ayachi A, Piarroux R, Botterel F, Houzé S, Desoubreux G, Hennequin C, Dannaoui E. Terbinafine Resistance in Dermatophytes: A French Multicenter Prospective Study. *J Fungi (Basel)*. 2022 Feb 23;8(3):220. doi: 10.3390/jof8030220. PMID: 35330222; PMCID: PMC8948947.
- 113) Bidaud AL, Normand AC, Jabet A, Brun S, Delliére S, Cremer G, Foulet F, Ayachi A, Imbert S, Hennequin C, Dannaoui E, Moreno-Sabater A. Reliability of a terbinafine agar containing method for the screening of dermatophyte resistance. *Med Mycol*. 2023 May 1;61(5):myad043. doi: 10.1093/mmy/myad043. PMID: 37076775.
- 114) Gupta AK, Venkataraman M, Hall DC, Cooper EA, Summerbell RC: The emergence of Trichophyton indotinea: implications for clinical practice. *Int J Dermatol*, 2022, doi: 10.1111/ijd.16362.
- 115) Taghipour S, Shamsizadeh F, Pchelin IM, Rezaei-Matehkolaei A, Zarei Mahmoudabadi A, Valadan R, Ansari S, Katirae F, Pakshir K, Zomorodian K, Abastabar M. Emergence of Terbinafine Resistant Trichophyton mentagrophytes in Iran, Harboring Mutations in the Squalene Epoxidase (SQLE) Gene. *Infect Drug Resist*. 2020;13:845-850 <https://doi.org/10.2147/IDR.S246025>
- 116) Jia S, Long X, Hu W, Zhu J, Jiang Y, Ahmed S, de Hoog GS, Liu W, Jiang Y. The epidemic of the multiresistant dermatophyte Trichophyton indotinea has reached China. *Front Immunol*. 2023 Feb 16;13:1113065. doi: 10.3389/fimmu.2022.1113065. PMID: 36874152; PMCID: PMC9978415.
- 117) Siopi, M.; Efstathiou, I.; Théodoropoulos, K.; Pourmaras, S.; Meletiadis, J. Épidémiologie moléculaire et sensibilité aux antifongiques des isolats de trichophyton en Grèce : émergence de mentagrophytes de Trichophyton résistants à la terbinafine de type VIII localement et globalement. *J. Fungi* 2021, 7, 419. <https://doi.org/10.3390/jof7060419>
- 118) Nenoff P, Verma SB, Ebert A, Süß A, Fischer E, Auerswald E, Dessoi S, Hofmann W, Schmidt S, Neubert K, Renner R, Sohl S, Hradetzky U, Krusche U, Wenzel HC, Staginnus A, Schaller J, Müller V, Tauer C, Gebhardt M, Schubert K, Almstafa Z, Stadler R, Fuchs A, Sitaru C, Retzlaff C, Overbeck C, Neumann T, Kerschitzki A, Krause S, Schaller M, Walker B, Walther T, Köhler L, Albrecht M, Willing U, Monod M, Salamin K, Burmester A, Koch D, Krüger C, Uhrlab S. Spread of Terbinafine-Resistant *Trichophyton mentagrophytes* Type VIII (India) in Germany—"The Tip of the Iceberg?". *J Fungi (Basel)*. 2020 Oct 5;6(4):207. doi: 10.3390/jof6040207. PMID: 33027904; PMCID: PMC7712673.
- 119) Delliére S, Joannard B, BENDERDOUCHE M, Mingui A, GITS-MUSELLI M, Hamane S, Alanio A, Petit A, Gabison G, Bagot M, Bretagne S. Emergence of Difficult-to-Treat Tinea Corporis Caused by Trichophyton mentagrophytes Complex Isolates, Paris, France. *Emerg Infect Dis*. 2022 Jan;28(1):224-228. doi: 10.3201/eid2801.210810. PMID: 34932462; PMCID: PMC8714205.
- 120) Zeshan F, Sabir M, Uddin F. The rising menace of antifungal resistance in dermatophytes among the patients of tinea capitis. *J Pak Med Assoc*. 2023 Jan;73(1):43-48. doi: 10.47391/JPMA.5307. PMID: 36842005.
- 121) Cusack TP, Ashley EA, Ling CL, Roberts T, Turner P, Wangrangsimakul T, Dance DAB. Time to switch from CLSI to EUCAST? A Southeast Asian perspective. *Clin Microbiol Infect*. 2019 Jul;25(7):782-785. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.016. Epub 2019 Mar 25. PMID: 30922928; PMCID: PMC6587905.
- 122) Kassim A, Omuse G, Premji Z, Revathi G. Comparison of Clinical Laboratory Standards Institute and European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing guidelines for the interpretation of antibiotic susceptibility at a University teaching hospital in Nairobi, Kenya: a cross-sectional study. *Ann Clin Microbiol Antimicrob*. 2016 Apr 11;15:21. doi: 10.1186/s12941-016-0135-3. PMID: 27068515; PMCID: PMC4827198.
- 123) Salehi Z, Shams-Ghahfarokhi M, Razzaghi-Abyaneh M. Molecular Epidemiology, Genetic Diversity, and Antifungal Susceptibility of Major Pathogenic Dermatophytes Isolated From Human Dermatophytosis. *Front Microbiol*. 2021 Jun 4;12:643509. doi: 10.3389/fmicb.2021.643509. PMID: 34149634; PMCID: PMC8213211.
- 124) Gräser Y, Scott J, Summerbell R. The new species concept in dermatophytes—a polyphasic approach. *Mycopathologia*. 2008 Nov-Dec;166(5-6):239-56. doi: 10.1007/s11046-008-9099-y. Epub 2008 May 14. PMID: 18478366.
- 125) Garcia-Martinez J, López Lacombe D, Castaño Pascual A. Evaluation of a Method for Long-Term Cryopreservation of Fungal Strains. *Biopreserv Biobank*. 2018 Apr;16(2):128-137. doi: 10.1089/bio.2017.0101. Epub 2018 Jan 25. PMID: 29369693.
- 126) YoonJung, S. (2022, December). *Whole genome sequencing cost 2023*. Genetic testing for rare diseases company. <https://3billion.io/blog/whole-genome-sequencing-cost-2023#:~:text=The%20major%20market%20leader%20illumina,results%20at%20twice%20the%20speed>.
- 127) Pérez-Rodríguez, A.; Duarte-Escalante, E.; Frías-De-León, M.G.; Acosta Altamirano, G.; Meraz-Ríos, B.; Martínez-Herrera, E.; Arenas, R.; Reyes-Montes, M.d.R. Phenotypic and Genotypic Identification of Dermatophytes from Mexico and Central American Countries. *J. Fungi* 2023, 9, 462. <https://doi.org/10.3390/jof9040462>
- 128) Švarcová M, Větrovský T, Kolářik M, Hubka V. Defining the relationship between phylogeny, clinical manifestation, and phenotype for Trichophyton mentagrophytes/interdigitale complex: a literature review and taxonomic recommendations. *Med Mycol*. 2023 May 1;61(5):myad042. doi: 10.1093/mmy/myad042. PMID: 37070928; PMCID: PMC10148955.
- 129) Chowdhary A, Singh A, Singh PK, Khurana A, Meis JF. Perspectives on misidentification of Trichophyton interdigitale/Trichophyton mentagrophytes using internal transcribed spacer region sequencing: Urgent need to update the sequence database. *Mycoses*. 2019 Jan;62(1):11-15. doi: 10.1111/myc.12865. Epub 2018 Nov 15. PMID: 30367553.
- 130) Rudramurthy, S.M.; Shaw, D.; Shankararayan, S.A.; Abhishek; Dogra, S. Comprehensive Taxonomical Analysis of *Trichophyton mentagrophytes/interdigitale* Complex of Human and Animal Origin from India. *J. Fungi* 2023, 9, 577. <https://doi.org/10.3390/jof9050577>
- 131) Mirhendi H, Makimura K, de Hoog GS, Rezaei-Matehkolaei A, Najafzadeh MJ, Umeda Y, Ahmadi B. Translation elongation factor 1- α gene as a potential taxonomic and identification marker in dermatophytes. *Med Mycol*. 2015 Apr;53(3):215-24. doi: 10.1093/mmy/myu088. Epub 2014 Dec 30. PMID: 25550390.
- 132) Taghipour S, Pchelin IM, Zarei Mahmoudabadi A, Ansari S, Katirae F, Rafiei A, Shokohi T, Abastabar M, Taraskina AE, Kermani F, Diba K, Nouripour-Sisakht S, Najafzadeh MJ, Pakshir K, Zomorodian K, Ahmadi K, Rezaei-Matehkolaei A. Trichophyton mentagrophytes and T interdigitale genotypes are associated with particular geographic areas and clinical manifestations. *Mycoses*. 2019 Nov;62(11):1084-1091. doi: 10.1111/myc.12993. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31444823.
- 133) Klinger M, Theiler M, Bosshard PP. Epidemiological and clinical aspects of Trichophyton mentagrophytes/Trichophyton interdigitale infections in the Zurich area: a retrospective study using genotyping. *J Eur Acad Dermatol Venerol*. 2021 Apr;35(4):1017-1025. doi: 10.1111/jdv.17106. Epub 2021 Feb 3. PMID: 33411941.
- 134) Fréalte E, Rodrigue M, Gantois N, Aliouat CM, Delaporte E, Camus D, Dei-Cas E, Kauffmann-Lacroix C, Guillot J, Delhaes L. Phylogenetic analysis of Trichophyton mentagrophytes human and animal isolates based on MnSOD and ITS sequence comparison. *Microbiology (Reading)*. 2007 Oct;153(Pt 10):3466-3477. doi: 10.1099/mic.0.2006/004929-0. PMID: 17906145.
- 135) Kumar M, Thomas P, V A, Nair SS, Bagra JK, Chaturvedi VK, Kumar B, Kumar A, Rudramurthy SM, Abhishek. Molecular epidemiology of Trichophyton infections among canines from Northern India. *J Mycol Med*. 2023 Mar;33(1):101352. doi: 10.1016/j.mycmed.2022.101352. Epub 2022 Nov 21. PMID: 36459816.
- 136) Jabet A, Brun S, Normand AC, Imbert S, Akhoundi M, Dannaoui E, Audiffred L, Chasset F, Izri A, Laroche L, Piarroux R, Bachmeyer C, Hennequin C, Sabater AM. Extensive Dermatophytosis Caused by Terbinafine-Resistant Trichophyton indotinea, France. *Emerg Infect Dis*. 2022 Jan;28(1):229-233. doi: 10.3201/eid2801.210883. PMID: 34932456; PMCID: PMC8714191.

8. Annexes

Accréditation BELAC sous l'ISO 15189 (BELAC 128 MED)

CENTRE DE RÉFÉRENCE POUR LES MYCOSES

FORMULAIRE A ENVOYER AVEC L'ÉCHANTILLON AU CENTRE DE RÉFÉRENCE

Professeur Marie-Pierre HAYETTE
Service de Microbiologie Clinique-CHU de Liège- Sart-Tilman B23- 4000 Liège
Tél. 04/366.24.39 - Fax 04/366.24.40- Email: mphayette @chuliege.be

*IDENTIFICATION DU LABORATOIRE QUI ENVOIE L'ÉCHANTILLON

*Nom du responsable :
*Nom du laboratoire :
*Adresse (ou cachet) :
Code postal + localité :
N° d'agrégation :
Tél. : Fax :
Adresse Email contact :
*Nom du médecin demandeur :
et N° INAMI :

RENSEIGNEMENTS CONCERNANT LE PATIENT

*Nom (initiales/autre code) :
*Sexe : H F
*Date de naissance (ou âge) :
*Code postal/Localité :
Nationalité : Origine :
Séjour récent à l'étranger : oui/durée : non
Si oui, pays ou région :

RENSEIGNEMENTS CONCERNANT L'ÉCHANTILLON

*Numéro d'identification :
Ex. microscopique direct :
Nature: Levure Filamenteux Inconnu
*Souche isolée de :
 Prélèvement respiratoire :
 Sang :
Phanères: ongle pied ongle main cheveu cuir chevelu peau Si peau, préciser le site de prélèvement :
 Autre :
*Date de prélèvement :
*Identification présumée :

*Indispensable

CADRE RÉSERVÉ À L'ÉTUDE 2022 RÉSISTANCE À LA TERBINAFINE

Localisation de la lésion :
Lésion étendue : Oui Non
Patient sous traitement : Oui Non
Si oui, nom du traitement :

INFORMATIONS CLINIQUES

*Selon le cas préciser les symptômes observés:

Mycose profonde:.....
 Mycose sous-cutanée:.....
 Mycose superficielle :.....

*Facteurs associés :

Traitement par immunosupresseurs VIH Corticoïdes
 Hémopathie
 Transplantation d'organe de M.osseuse : date :
 Diabète autre :.....
 Commentaires :.....

INFORMATIONS ÉPIDÉMIOLOGIQUES

Mode de transmission probable

Dermatophytes
 Familial Communautaire Contact avec animal :.....
 Autres :.....

ANALYSES DEMANDÉES

Identification Antifungigramme
 PCR Pneumocystis (confirmation de l'immunofluorescence sur LBA)
 PCR *Aspergillus* (examen direct positif avec culture négative)
 Génomotypage dermatophytes (en cas d'épidémie)

AUTRES INFORMATIONS IMPORTANTES

Formulaire de demande Mycoses 28.07.22

MQ.A11.45 v08

Annexe 1 : formulaire d'envoi d'échantillon dans le cadre de l'étude ERT menée par le CNR.

Laboratoires participants	Région
A.M.L Lab	Flamande (Anvers)
Anacura	Flamande (Evergem)
AZ Maria Middelaes	Flamande (Gand)
AZ Sint Lucas	Flamande (Gand)
AZ sint-jan	Flamande (Bruges)
CHC MontLégia	Wallonne (Liège)
CHU Liège	Wallonne (Liège)
CHU Saint-Pierre	Bruxelles (Bruxelles)
Clinique Saint-Luc Bouge	Wallonne (Namur)
Clinique St-Pierre (Ottignies)	Wallonne (Ottignies-Louvain-la-Neuve)
CMA Medische Analysen	Flamande
Heilig Hart Ziekenhuis	Flamande (Anvers)
St Nikolaus-Hospital Eupen	Wallonne (Eupen)
U.Z. Antwerpen	Flamande (Anvers)
UZ Brussel	Bruxelles (Jette)
UZ Gent	Flamande (Gand)
UZ Leuven	Flamande (Louvain)

Annexe 2 : Liste des laboratoires participants à l'étude menée par le CNR entre le 04/2022 et 04/2023.



Abstract

Les dermatophytoses représentent un problème majeur à l'échelle mondiale, avec une prévalence située entre 20 à 25%. La résistance aux antifongiques, en particulier à la terbinafine, est devenue assez préoccupante depuis 2018. Cette résistance a été majoritairement observée en Inde dans des cas de dermatophytoses, mais elle se propage également à l'échelle mondiale, y compris en Belgique.

Dans ce contexte, il devient essentiel de disposer d'outils permettant d'évaluer le profil de résistance et de caractériser les souches de dermatophytes. Le Centre National de Référence des Mycoses de Liège (CNRLM) joue un rôle essentiel dans l'identification des souches de dermatophytes en Belgique. Il utilise généralement une combinaison d'examen macroscopiques et microscopiques, couplée au séquençage du gène ITS2 afin de parvenir à une identification précise de l'espèce responsable de l'infection.

Cependant, la caractérisation des souches appartenant au complexe des espèces *Trichophyton interdigitale*/*mentagrophytes*/*indotinea* s'avère particulièrement difficile en raison de leur forte proximité phénotypique et génotypique. Même si l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF est courante, cette méthode présente des limites dans la distinction entre les espèces du complexe étudié. C'est pourquoi une nouvelle approche basée sur le gène EF1-alpha a été mise au point durant cette étude. Cette approche a démontré d'excellents résultats et pourrait également être utilisée pour différencier d'autres espèces difficiles à discriminer. Une méthode développée par le CNRLM, appelée Dermacheck, est également utilisée en combinaison avec la méthode EUCAST pour confirmer le profil de résistance des souches. Cette approche s'est révélée être à la fois sensible et spécifique dans la détermination de la résistance. Dans le cadre de ce mémoire, la contribution de 17 laboratoires basés en Belgique a été sollicitée, mobilisant un total de 173 souches de dermatophytes. Cette collaboration multicentrique a permis d'aboutir à représentation diversifiée des souches résistantes à la terbinafine qui circulent en Belgique, renforçant ainsi la fiabilité des résultats obtenus en vue d'une future application aux pratiques cliniques et épidémiologiques.