

ANNÉE 2018

N° 21

THÈSE

pour le

DIPLÔME D'ÉTAT

DE DOCTEUR EN PHARMACIE

par

Thomas DELAHAYE

Présentée et soutenue publiquement le 29 juin 2018

**Champignons filamenteux contaminant l'environnement
industriel pharmaceutique :
Intérêts et limites des méthodes d'identification actuelles**

Président : Mr Y. F. POUCHUS, Professeur en sciences végétales et fongiques

Membres du jury : Mr N. RUIZ, Maître de Conférences en botanique et mycologie
Mme F. LE GALLOU, Praticien Hospitalier Bactériologie-Hygiène

Université de Nantes



Faculté de Pharmacie Serment

Je jure, en présence des maîtres de la faculté et de mes condisciples :

D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.

Le Doyen de la Faculté

Remerciements

A Mr Yves-François POUCHUS, Président du jury

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury. Vous avez toujours su capter mon attention avec les anecdotes parsemées dans vos enseignements, ce qui en facilitait l'apprentissage.

A Mr Nicolas RUIZ, Directeur de cette thèse

Je vous remercie d'avoir accepté la direction de cette thèse. Je ne sais pas si vous vous étiez rendu-compte, dès octobre 2015, de l'ampleur, ou du moins de la longueur, de la tâche qui se présentait à nous. Je vous remercie pour votre patience, pour votre disponibilité et pour votre implication, parfois même tard dans la nuit ces derniers jours, qui m'ont permis de finaliser ce travail. Je vous en suis très reconnaissant.

A Mme Florence LE GALLOU, Responsable de l'unité de Contrôles microbiologiques du CHU de Nantes et membre du Jury

Je vous remercie d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse. Mon passage à vos côtés, au sein du service Bactériologie Hygiène, m'a beaucoup appris et m'a servi pour la suite de ma formation d'une part, et de mon métier d'autre part.

A mes grands parents, mamie Janine et papy Michel,

Je vous remercie pour toutes les vacances que nous avons passées ensemble avec les cousins/cousines. Tous ces bons moments partagés en France ou à l'étranger, à la mer ou à la montagne... Nous en garderons toujours de très bons souvenirs !!!

A ma mamie Piano,

Je me souviens de moments passés sur des rédactions de français et de tes délicieuses bûches de Noël et galettes des rois que j'attendais chaque année avec impatience... Je te remercie pour tous les fous-rires que nous avons pu avoir. J'ai aussi une petite pensée pour papy Henri, qui j'espère aurait été fier de me voir aboutir ces longues études.

A mes parents Véronique et Eric,

Je vous remercie pour tout ce que vous m'avez apporté depuis ces 28 longues années. Les valeurs que vous m'avez transmises, être simple, juste et respectueux me sont plus que jamais utiles au quotidien. C'est clairement grâce à vous, à votre soutien, à nos passions, que j'en suis arrivé là aujourd'hui.

A mon frère Antoine, sa femme Sarah, mon neveu et ma nièce Alec et Sheïma,

Je te remercie d'avoir fait les quatre cents coups avant mon passage. Notre différence de tempérament m'a permis d'avoir une enfance plus paisible. Je trouve que tu as bien changé maintenant que tu as fondé ta petite famille. J'admire ton côté « papa poule » que tu as développé pour tes enfants. Je croise les doigts pour que ton nouveau challenge de restauration sur Nantes rencontre un franc succès.

A toute ma famille,

Merci pour votre soutien et l'intérêt que vous avez portés à mes études et à cette thèse durant toutes ces longues années.

A Camille et Stéphane,

Toute une histoire ! Entre nos longs, parfois très longs footing Lyonnais... en terrasse, nos week-ends ski... sans neige, nos vacances en Bretagne... sous la pluie, notre amitié est restée intacte malgré tout, et c'est avec beaucoup de plaisir que nous retrouvons à chaque fois...

Aux Bioprods et leur « +1 »,

Imaginez, ... Imaginez que nous ne nous soyons jamais rencontrés... Moi, je ne l'imagine pas. Ma vie lyonnaise a été la meilleure année de mes études avec notre cher Monsieur Lawton. Nos weekends ski, nos weekends mer, nos sorties culturelles, nos sorties festives, notre passion pour la gastronomie et l'œnologie sont de vrais moments de partage et de simplicité. J'ai vraiment hâte de vous retrouver...

A tous mes amis, et notamment, Coraline, Jean François et Simon

Merci pour votre amitié qui reste inchangée malgré la distance et le temps qui passe à toute vitesse.

Au portail rue de la Blanche,

Sans qui, je n'aurai jamais eu d'arrêt de travail me permettant de finir ma thèse...

A Chloë,

Tu ne t'imagines même pas la pression que tu m'as mise quand tu t'es décidée à soutenir ta thèse au mois de juillet 2018 soit moins d'un an après l'avoir initiée. J'admire ta détermination et ton courage dans les épreuves. Tu sais me soutenir quand j'en ai besoin. Merci pour ces belles années partagées à tes côtés et pour les très nombreuses autres à venir. Nous allons enfin pouvoir passer à autre chose !

Sommaire

Remerciements.....	2
Sommaire	4
Table des abréviations.....	7
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures	9
Introduction.....	11
Partie I : Contexte réglementaire du suivi environnemental dans l'industrie pharmaceutique	14
1. Zones à atmosphère contrôlée.....	15
1.1. Définition.....	15
1.2. Classification des salles propres	15
1.3. Exemple d'une ligne caractéristique d'un site de production de médicaments stériles injectables	17
2. Suivi environnemental	19
2.1. Rationnel.....	19
2.2. Moyens de prélèvement	19
2.3. Fréquence de prélèvement	21
2.4. Exemple d'un plan d'échantillonnage des contrôles microbiologiques d'une ZAC A dans B	22
3. Identification des microorganismes	23
4. Synthèse	24
Partie II : Champignons filamenteux et environnement industriel pharmaceutique	26
1. Champignons filamenteux	27
1.1. Définitions	27
1.2. Caractéristiques morphologiques générales.....	27
1.3. Classification	29
2. Sources de contamination et de dissémination fongique en environnement industriel pharmaceutique .	34
2.1. Milieu.....	34
2.2. Matériel.....	35
2.3. Main d'œuvre.....	35
2.4. Méthode	36
2.5. Matière.....	36
2.6. Synthèse	36
3. Impact des moisissures en environnement industriel pharmaceutique.....	38
3.1. Impacts sur l'environnement et/ou la qualité du produit fini	38
3.2. Impacts sur la sécurité du patient.....	39
4. Moisissures principalement observées dans l'environnement industriel pharmaceutique	43
4.1. Le genre <i>Aspergillus</i>	44
4.1.1. Historique.....	44
4.1.2. Classification.....	44

4.1.3. Description morphologique.....	45
4.2. Le genre <i>Cladosporium</i>	46
4.2.1. Historique.....	46
4.2.2. Classification.....	47
4.2.3. Description morphologique.....	47
4.3. Le genre <i>Penicillium</i>	48
4.3.1. Historique.....	48
4.3.2. Classification.....	49
4.3.3. Description morphologique.....	50
5. Exemple d'un bilan fongique d'un site de production de médicaments stériles injectables	53
6. Synthèse	55
Partie III : Méthodes d'identification fongique et application dans un contexte industriel pharmaceutique	56
1. Approches phénotypiques.....	57
1.1. Description morphologique et physiologique	57
1.1.1. Caractères macroscopiques	57
1.1.2. Caractères physiologiques.....	57
1.1.3. Caractères microscopiques.....	58
1.2. Méthode de PITT	58
1.3. Intérêts et limites.....	60
2. Approches génomiques.....	61
2.1. Principe général	61
2.2. Marqueurs moléculaires d'intérêts.....	61
2.2.1. Les gènes de l'ARN ribosomique	62
2.2.2. Les gènes codant pour les protéines nucléaires.....	64
2.2.3. Exemples d'identifications de champignons filamenteux en environnement industriel pharmaceutique.....	65
2.2.4. Synthèse	68
2.3. Intérêts et limites.....	69
3. Approches protéomiques.....	70
3.1. Définitions	70
3.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	71
3.2.1. Principe	71
3.2.2. Désorption Ionisation	72
3.2.3. Spectrométrie à temps de vol	72
3.2.4. Spectre de masse	73
3.3. Application à l'identification des champignons.....	74
3.4. Intérêts et limites.....	76
4. Approches métabolomiques.....	78
4.1. Définitions	78

4.2. Méthode	79
4.2.1. Chromatographie	79
4.2.2. Spectrométrie de masse	80
4.2.3. Analyse des données	81
4.2.4. Approche métabolomique appliquée à l'identification des champignons	83
4.2.5. Exemples de recherche ciblée de métabolites spécifiques de champignon	84
4.3. Intérêts et limites.....	86
5. Exemple d'une stratégie d'identification des souches fongiques sur un site de production de médicaments stériles.....	88
Conclusion	91
Bibliographie.....	95

Table des abréviations

A3P : Association pour les Produits Propres et Stériles

ACP : Analyse en Composante Principale

ADC : Article De Conditionnement

ANSM : Agence Nationale de Sécurité du Médicament

BC : Bouchons

CLHP : Chromatographie Liquide Haute Performance

COV : Composé Organique Volatil

CPG : Chromatographie Phase Gazeuse

CYA : Czapek Yeast Extract

ddNTP : didésoxyribonucléotide

dNTP : désoxyribonucléotide

G25N : Glucose Nitrate Agar

GC-MS : Gaz Chromatography Mass Spectrometry

GMP : Good Manufacturing Practice

HEPA : High Efficiency Particulate Air

HRMS : High Resolution Mass Spectrometry

LC-MS : Liquid Chromatography Mass Spectrometry

MALDI : Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation

MCOV : Microbial Volatile Organic Compounds

MEA : Malt Extract Agar

nuc-LSU : nuclear-Large SubUnit

nuc-SSU : nuclear-Small SubUnit

PA : Principe Actif

PCR : Polymerase Chain Reaction

PDA : Potato Dextrose Agar

PF : Produit Fini

PLS-DA : Partial Least Square- Discriminant Analyse

RABS : Restricted Access Barrier System

TOF : Time Of Flight

UFC : Unité Formant des Colonies

ZAC : Zone à Atmosphère Contrôlée

Liste des tableaux

TABEAU 1 : LIMITES RECOMMANDEES DE CONTAMINATION PARTICULAIRE DANS LES EUGMP (D'APRES <i>EU</i> GMP ANNEX 1).....	16
TABEAU 2 : LIMITES RECOMMANDEES DE CONTAMINATION MICROBIOLOGIQUE DANS LES EUGMP (D'APRES <i>EU</i> GMP ANNEX 1)	16
TABEAU 3 : LIMITES RECOMMANDEES DE CONTAMINATION PARTICULAIRE DANS L'USP 36 <1116> (D'APRES L'USP 36 CHAPTER 1116)	17
TABEAU 4 : LIMITES RECOMMANDEES DE CONTAMINATION MICROBIENNE DANS L'USP 36 <1116> (D'APRES L'USP 36 CHAPTER 1116)	17
TABEAU 5: EXEMPLE DE FREQUENCE DE PRELEVEMENT POUR LE SUIVI MICROBIOLOGIQUE D'UN SITE DE REPARTITION DE VACCIN (D'APRES WHO, 2012).....	21
TABEAU 6 : MYCOTOXINES REGLEMENTEES ET MOISSURES PRODUCTRICES ASSOCIEES (ADAPTE D'APRES AFSSA, 2009)	40
TABEAU 7 : MYCOTOXINES NON REGLEMENTEES ET MOISSURES PRODUCTRICES ASSOCIEES (ADAPTE D'APRES AFSSA, 2009)	40
TABEAU 8 : EFFETS DES PRINCIPALES MYCOTOXINES CHEZ L'HOMME (ADAPTE D'APRES AFFSA, 2009)	41
TABEAU 9 : TAXONOMIE DU GENRE <i>ASPERGILLUS</i>	44
TABEAU 10 : TAXONOMIE DU GENRE <i>CLADOSPORIUM</i>	47
TABEAU 11 : TAXONOMIE DU GENRE <i>PENICILLIUM</i>	49
TABEAU 12 : TEMPERATURES D'INCUBATION EN FONCTION DES MILIEUX DE CULTURE POUR L'IDENTIFICATION DES <i>PENICILLIUM</i> PAR LA METHODE DE PITT.....	59
TABEAU 13 : RESUME DES DIFFERENCES ENTRE LES SOUS GENRES DE <i>PENICILLIUM</i> SELON LA METHODE DE PITT	60
TABEAU 14 : PRINCIPAUX MARQUEURS FONGIQUES DISPONIBLES DANS LES BASES DE DONNEES EN 2009 (D'APRES BEGEROW ET AL. 2010 MODIFIE).....	69
TABEAU 15 : FAMILLES DE METABOLITES PRODUITS PAR NEUF ESPECES DE <i>PENICILLIUM</i> (ADAPTE D'APRES FRISVAD ET AL., 2004)	85
TABEAU 16 : STRATEGIE D'IDENTIFICATION DES SOUCHES FONGIQUES DANS L'ENVIRONNEMENT INDUSTRIEL PHARMACEUTIQUE	88

Liste des figures

FIGURE 1 : SCHEMA D'UNE LIGNE CARACTERISTIQUE DE REPARTITION ASEPTIQUE.....	18
FIGURE 2 : PRELEVEUR AIR IDEAL (BIOMERIEUX).....	20
FIGURE 3 : EXEMPLE D'UN PLAN D'ECHANTILLONNAGE DES CONTROLES MICROBIOLOGIQUES	22
FIGURE 4 : STRUCTURE DE L'HYPHE. (A) HYPHE COENOCYTIQUE. (B) HYPHE SEPTÉE. (ROLAND, ROLAND, AND EL MAAROUF-BOUTEAU 2008)	28
FIGURE 5 : SCHEMA DE LA STRUCTURE DE LA PAROI FONGIQUE (LECELLIER 2013)	28
FIGURE 6 : THE EUCARYOTES TREE OF LIFE (ADAPTÉ D'APRÈS S. L. BALDAUF 2003)	30
FIGURE 7 : LES GRANDS GROUPES DES EUMYCETES (ADAPTE D'APRES HIBBETT ET AL. 2007).....	30
FIGURE 8 : CYCLE DE VIE DE L'ESPECE <i>EUTOTIUM RUBRUM</i> (ADAPTE D'APRES SOSA 2015).....	32
FIGURE 9 : DIAGRAMME D'ISHIKAWA DES SOURCES POTENTIELLES DE CONTAMINATION MICROBIENNE	34
FIGURE 10 : PRINCIPAUX GENRES DE CHAMPIGNONS RENCONTRES DANS LES INDUSTRIES PHARMACEUTIQUES (CARLOTTI, 2014).....	43
FIGURE 11 : MORPHOLOGIE MACROSCOPIQUE D'UNE CULTURE D' <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> (MILIEU DCA, COLLECTION MMS, UNIVERSITE DE NANTES).....	45
FIGURE 12 : SCHEMA DE LA STRUCTURE D'UN CONIDIOPHORE D'UN <i>ASPERGILLUS</i> (HTTP://MYCOTA-CRCC.MNH.NFR/SITE/GENREDETAIL.PHP?NUM=4&N=ASPERGILLUS)	46
FIGURE 13 : MORPHOLOGIE MACROSCOPIQUE D'UNE CULTURE DE <i>CLADOSPORIUM SPHAEROSPERNUM</i> (MILIEU PDA, MEDMYCO, CC BY-SA 4.0)	47
FIGURE 14 : SCHEMA DE LA STRUCTURE D'UN CONIDIOPHORE D'UN <i>CLADOSPORIUM</i> (HTTP://MYCOTA-CRCC.MNH.NFR/SITE/GENREDETAIL.PHP?LANG=ENG&NUM=10&N=CLADOSPORIUM)	48
FIGURE 15 : MORPHOLOGIE D'UNE SOUCHE DE <i>PENICILLIUM</i> SP. (MILIEU YES, COLLECTION MMS, UNIVERSITE DE NANTES).....	50
FIGURE 16 : SCHEMA DE LA STRUCTURE DE CONIDIOPHORES D'UN <i>PENICILLIUM</i> (HTTP://MYCOTA-CRCC.MNH.NFR/SITE/GENREDETAIL.PHP?NUM=33&N=PENICILLIUM).....	51
FIGURE 17 : ORGANISATION DES PINCEAUX DE <i>PENICILLIUM</i> (D'APRES HTTP://WWW.UNIV-BREST.FR/ESIABSCIENTIFIQUE/MYCOLOGIE/METHODES+D'IDENTIFICATION+PENICILLIUM)	51
FIGURE 18 : BILAN MICROBIOLOGIQUE DES IDENTIFICATIONS FONGIQUES 2015	53
FIGURE 19 : REPARTITION DU NOMBRE D'IDENTIFICATION DES SOUCHES FONGIQUES EN FONCTION DES CLASSES DES ZAC	53
FIGURE 20 : REPARTITION DU NOMBRE D'IDENTIFICATION DES SOUCHES FONGIQUES DE LA CLASSE A EN FONCTION DU LIEU DE PRELEVEMENT	54
FIGURE 21 : REPARTITION DU NOMBRE D'IDENTIFICATION DES SOUCHES FONGIQUES DE LA CLASSE B EN FONCTION DU LIEU DE PRELEVEMENT	54
FIGURE 22 : COMPARAISON DE SEQUENCES VARIABLES DE TROIS ESPECES DISTINCTES (D'APRES TAKWEEN.COM)	62

FIGURE 23 : ORGANISATION DES GENES CODANT LES ARN RIBOSOMIQUES ET DES REGIONS INTERGENIQUES CHEZ LES CHAMPIGNONS ET PRESENTANT UN INTERET POUR L'IDENTIFICATION MOLECULAIRE.....	63
FIGURE 24 : SEQUENCES DU GENE CODANT L'ARNr 28S OBTENUES A PARTIR DE TROIS ECHANTILLONS D'ENVIRONNEMENTS INDUSTRIELS PHARMACEUTIQUES. A, ECHANTILLON N°1 ; B, ECHANTILLON N°2 ; C, ECHANTILLON N° 3.	65
FIGURE 25 : RESULTATS DES COMPARAISONS DE SEQUENCES D'ARNr28S OBTENUS POUR LES TROIS ECHANTILLONS D'ENVIRONNEMENTS INDUSTRIELS PHARMACEUTIQUES. A, ECHANTILLON N°1 ; B, ECHANTILLON N°2 ; C, ECHANTILLON N° 3.	66
FIGURE 26 : RESULTATS DES COMPARAISONS DE SEQUENCES DE B-TUBULINE OBTENUS POUR LES TROIS ECHANTILLONS D'ENVIRONNEMENTS INDUSTRIELS PHARMACEUTIQUES. A, ECHANTILLON N°1 ; B, ECHANTILLON N°2 ; C, ECHANTILLON N° 3.	67
FIGURE 27 : PRINCIPE D'IONISATION PAR LA TECHNIQUE MALDI (HTTPS://FR.WIKIPEDIA.ORG/WIKI/D%C3%A9sorption-ionisation_laser_assist%C3%A9_par_matrice)	72
FIGURE 28 : PRINCIPE TOF (HTTP://IMAGES.GOOGLE.FR/IMGRES?IMGURL=HTTP%3A%2F%2Fbiochimiedesproteines)	73
FIGURE 29 : SPECTRE GENERE LORS D'UNE ANALYSE MALDI-TOF (D'APRES BIOMERIEUX)	73
FIGURE 30 : EMPREINTES SPECTRALES OBTENUES A PARTIR DE QUATRE ESPECES FONGIQUES DIFFERENTES (ADAPTE D'APRES HETTICK ET AL., 2008)	74
FIGURE 31 : EXEMPLE DE NIVEAU DE CONFIANCE FOURNI PAR LE VITEK® MS BIOMERIEUX.....	75
FIGURE 32 : SCHEMA GENERAL D'UN SPECTROMETRE DE MASSE	80
FIGURE 33 : COMPARAISON PAR SUPERPOSITION DE TROIS CHROMATOGRAMMES D'EXTRAITS BRUTS DE CHAMPIGNONS.....	81
FIGURE 34 : ELIMINATION DU BRUIT DE FOND SUR UN SPECTRE DE MASSE.....	82
FIGURE 35 : ALIGNEMENT DES PICS AVEC LE LOGICIEL MZMINE®	82
FIGURE 36 : EXEMPLE D'UNE ACP OBTENUE A PARTIR D'EXTRAITS BRUTS (N=5) DE QUATRE CHAMPIGNONS FILAMENTEUX CULTIVES SUR UN MILIEU IDENTIQUE	83

Introduction

Le nombre théorique des différentes espèces de champignons sur la Terre a été estimé à environ 1 500 000 espèces (Hawksworth, 2004), et environ 120 000 (soit 8%) seraient décrites, parmi lesquelles, plusieurs milliers de moisissures (Garon et *al.*, 2015). Ce sont des organismes ubiquistes retrouvés dans tous les écosystèmes et dont l'importance est considérable. Ils ont un intérêt particulier dans l'industrie alimentaire (fermentation alcoolique...), dans l'industrie biotechnologique (ADN recombinant...) ou encore dans l'industrie pharmaceutique (antibiotiques : pénicillines, streptomycines...). En revanche, certains peuvent avoir des effets néfastes sur la santé de l'homme ou la qualité des produits fabriqués dans ces industries (Botton et *al.*, 1990).

Ainsi, l'industrie pharmaceutique est soumise à un certain nombre de contraintes afin d'assurer la qualité et l'efficacité des médicaments produits ainsi que de garantir la sécurité du patient. L'une de ces contraintes est la maîtrise de la biocontamination dans l'environnement de production. Cette biocontamination est caractérisée par « la présence de microorganismes indésirables pouvant entraîner, chez l'homme ainsi que sur les médicaments, des perturbations qualitatives ou quantitatives, immédiates ou différées » (EudraLex - Volume 4 - Good Manufacturing Practice (GMP) Guidelines - European Commission). Les moisissures appartiennent donc à cette catégorie de microorganismes indésirables.

Les données sur la biocontamination, et plus précisément la contamination fongique, dans l'environnement industriel pharmaceutique, sont extrêmement pauvres. Bien que cette biocontamination soit connue des différents acteurs de ce milieu, elle reste cependant peu décrite jusqu'à présent pour des raisons évidentes de confidentialité et d'image de marque de cette industrie. Un site, spécialisé dans le médicament stérile injectable, a néanmoins accepté de communiquer un bilan annuel de ces identifications d'espèces fongiques.

Ce bilan dénombre un total de 57 identifications pour l'année 2015. Les champignons les plus fréquemment rencontrés sur ce site appartiennent aux genres, *Penicillium* à hauteur de 37%, *Cladosporium* à hauteur de 26% et *Aspergillus* à hauteur de 11%. Ces trois genres sont, par ailleurs, connus pour être des producteurs de mycotoxines. Ainsi, ce bilan met en lumière la problématique de la contamination fongique dans l'environnement industriel pharmaceutique.

Ce travail, non exhaustif, a donc pour objectif d'initier une réflexion sur la contamination fongique dans l'environnement pharmaceutique. Il permet également de s'interroger sur les méthodes actuelles mises en œuvre pour l'identification des champignons

non désirés dans cet environnement. En outre, le laboratoire de contrôle qualité de cette industrie pharmaceutique s'est vu exprimer ces dernières années un nouveau besoin ; celui de recourir à des méthodes d'identification des souches environnementales en routine à la fois fiables, robustes et peu coûteuses.

Ainsi, l'objectif de ce travail a consisté à répertorier les méthodes actuelles d'identification des champignons filamenteux puis de comparer leurs intérêts et leurs limites respectifs.

Les textes et les normes réglementaires évoluent chaque année et occupent une place de plus en plus prépondérante dans le quotidien d'un industriel pharmaceutique. C'est pourquoi, je présenterai, dans un premier temps, le contexte réglementaire du suivi environnemental dans ce milieu industriel afin d'en comprendre les contraintes.

Nous avons mis en évidence dans les paragraphes ci-dessus qu'un site peut dénombrer jusqu'à 57 contaminations d'origine fongique. Mais d'où proviennent ces contaminations ? Quels sont les risques ? Ainsi, dans un deuxième temps, je présenterai les principales caractéristiques des champignons filamenteux contaminants cet environnement pharmaceutique.

Afin de réduire cette contamination, il faut connaître son « ennemi » et cette connaissance commence par l'identification du champignon filamenteux mis en cause. C'est pourquoi, dans un troisième et dernier temps, je présenterai les différentes méthodes d'identification fongique en insistant sur les intérêts et les limites de chacune d'entre elles et leur application dans le cadre du suivi environnemental dans l'industrie pharmaceutique.

Partie I : Contexte réglementaire du suivi environnemental dans l'industrie pharmaceutique

1. Zones à atmosphère contrôlée

1.1. Définition

Une zone à atmosphère contrôlée (ZAC), également appelée salle blanche ou salle propre est « une salle dans laquelle la concentration des particules en suspension dans l'air est maîtrisée, et qui est construite et utilisée de façon à minimiser l'introduction, la production et la rétention de particules à l'intérieur de la pièce, et dans laquelle d'autres paramètres pertinents, tels que la température, l'humidité et la pression sont maîtrisés comme il convient » (norme ISO 14644-1, 1999). Toutes ces terminologies peuvent être rassemblées autour du terme plus générique d'environnement maîtrisé. Celui-ci correspond, d'après la norme ISO 14698-1, à une « zone définie où l'on maîtrise les sources de contamination à l'aide de moyens spécifiés » (norme ISO 14698-1, 2003). Ainsi, la classification de ces zones repose sur la contamination particulaire, traitée dans la norme ISO 14644, et sur la problématique de la biocontamination traitée dans la norme ISO 14698. Ces normes ont été reprises pour la mise à jour du référentiel américain, la pharmacopée USP 36 chapitre <1116> «*Microbiological control and monitoring of aseptic processing environments* » et adaptées dans le référentiel européen, l'*European Good Manufacturing Practice Annex 1 (euGMP)* «*Manufacture of sterile medicinal products* ».

1.2. Classification des salles propres

Les ZAC destinées à la fabrication des médicaments stériles sont classées « selon les qualités requises pour leur environnement » sur la base de la contamination particulaire. Quel que soit le référentiel, il existe deux états de fonctionnement d'une salle propre. L'état « au repos », est l'état où les locaux sont opérationnels avec le matériel de production en place, sans que les opérateurs soient à leur poste. L'état « en activité », est l'état où les locaux et les équipements fonctionnent selon le mode opératoire défini et en présence du nombre prévu d'opérateurs (GMP Guideline EU GMP Annex 1, 2008). Chaque opération de fabrication requiert un niveau approprié de propreté de l'environnement « en activité » de façon à réduire au minimum le risque de contamination particulaire ou microbienne des produits ou des substances manipulés.

L'annexe 1 des euGMP distingue quatre classes de ZAC. Les opérations à haut risque doivent être réalisées en classe A, classe la plus élevée en termes de propreté. Les activités de remplissage, les bols bouchons, les flacons ouverts ou encore les postes de travail sous flux

d'air laminaire en sont des exemples. La classe B constitue l'environnement immédiat d'une zone de travail de classe A. Les classes C et D sont destinées aux étapes moins critiques de la fabrication du médicament stérile comme son conditionnement secondaire : étiquette, notice, boîte par exemple. Les limites recommandées de la contamination particulaire en fonction de la zone classée, de son état d'activité ainsi que du diamètre des particules sont présentées dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Limites recommandées de contamination particulaire dans les euGMP (d'après euGMP Annex 1)

Grade	At rest		In operation	
	Max. permitted particles / m ³		Max. permitted particles / m ³	
	≥ 0.5 µm	≥ 5.0 µm	≥ 0.5 µm	≥ 5.0 µm
A	3,520	20	3,520	20
B	3,520	29	352,000	2,900
C	352,000	2,900	3,520,000	29,000
D	3,520,000	29,000	Not defined	Not defined

Les limites recommandées de la contamination microbiologique en fonction de la zone classée et du type de prélèvement sont présentées dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Limites recommandées de contamination microbiologique dans les euGMP (d'après euGMP Annex 1)

Grade	Air sample (CFU/m ³)	90 mm diameter settle plates (CFU/4hours)	55 mm diameter contact plates (CFU/plate)	Glove print (5 fingers) (CFU/glove)
A	<1	<1	<1	<1
B	10	5	5	5
C	100	50	25	-
D	200	100	50	-

L'environnement de la ZAC classée A, en contact direct avec le médicament, a des normes microbiologiques plus restrictives que l'environnement de la ZAC classée D où a lieu le conditionnement secondaire. En effet, alors que les euGMP autorisent 200 unités formant des colonies (UFC) /m³ dans l'air de la ZAC classée D, celle classée A doit dénombrer moins d'une UFC /m³, c'est-à-dire qu'aucun microorganisme ne doit être présent dans cette zone. Il en est de même pour les autres types de prélèvement : un total de 100 UFC par période de 4 heures est autorisé sur les boîtes de sédimentation pour un environnement classé D alors qu'aucun microorganisme n'est permis dans l'environnement classé A. Un total de 50 UFC par boîte contact est autorisé pour un environnement classé D alors qu'aucun microorganisme n'est permis dans l'environnement classé A. Enfin, les empreintes de gants ne sont monitorées uniquement dans les environnements les plus critiques classés A et B. L'objectif

de ces normes dégressives de la classe D vers la classe A est évidemment de protéger le médicament stérile.

La pharmacopée américaine, quant à elle, reprend les quatre classes ISO pour le nombre de particules totales. Elles sont nommées ISO 8, ISO7, ISO6 et ISO5, la plus élevée en termes de propreté. Les activités rencontrées dans ces classes sont similaires aux recommandations européennes mais les spécifications en sont différentes. Les limites recommandées de la contamination particulaire en fonction de la zone classée sont présentées dans le Tableau 3.

Tableau 3 : Limites recommandées de contamination particulaire dans l'USP 36 <1116> (d'après l'USP 36 chapter 1116)

ISO Class ^a	Particles $\geq 0.5 \mu\text{m}/\text{m}^3$
ISO 5	3520
ISO 6	35,200
ISO 7	352,000
ISO 8	3,520,000

Les limites recommandées de la contamination microbiologique en fonction de la zone classée et du type de prélèvement sont présentées dans le Tableau 4.

Tableau 4 : Limites recommandées de contamination microbienne dans l'USP 36 <1116> (d'après l'USP 36 chapter 1116)

Room Classification	Active Air Sample (%)	Settle Plate (9 cm) 4 h Exposure (%)	Contact Plate or Swab (%)	Glove or Garment (%)
Isolator/Closed RABS (ISO 5 or better)	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
ISO 5	<1	<1	<1	<1
ISO 6	<3	<3	<3	<3
ISO 7	<5	<5	<5	<5
ISO 8	<10	<10	<10	<10

1.3. Exemple d'une ligne caractéristique d'un site de production de médicaments stériles injectables

Une unité de production pharmaceutique, qui produit des médicaments stériles injectables sous forme sèche ou liquide dans un flacon, est composée d'un flux produit. Il débute par un article de conditionnement (ADC) et notamment le contenant du médicament, à savoir le flacon, pour aboutir au produit fini (PF), à savoir le flacon dosé avec un principe actif (PA) solide ou liquide, bouché avec un bouchon (BC) en caoutchouc, serti avec une

capsule, étiqueté avec une étiquette et mis en boîte. Ce type de ligne de production est généralement divisé en quatre zones présentées en Figure 1.

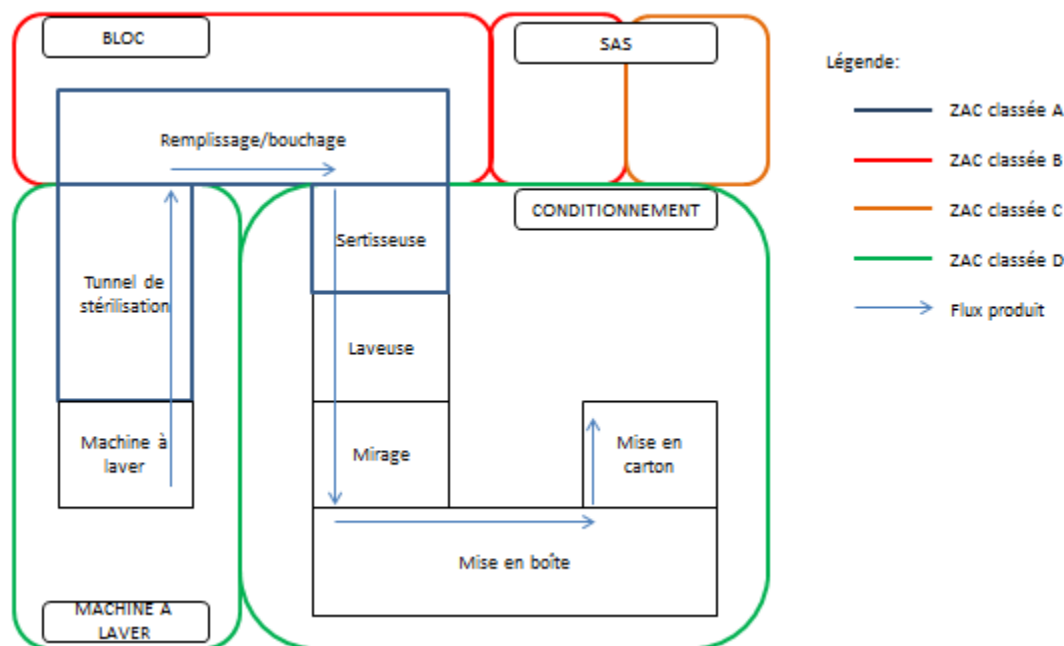


Figure 1 : Schéma d'une ligne caractéristique de répartition aseptique

La première zone de ce flux de production est appelée machine à laver. A ce stade, les modules de flacons palettisés sont ouverts et les flacons sont présentés à l'entrée de la machine à laver. Ils sont, à ce niveau, non bouchés et donc à la merci de tous les microorganismes présents dans l'environnement. Ils seront ensuite retournés et nettoyés, intérieur et extérieur, dans la machine à laver à l'aide d'eau et d'air comprimé stériles. Cette zone nécessite un environnement maîtrisé de type ZAC classée D, représentée en vert dans la Figure 1. Les flacons entrent, ensuite, dans le tunnel de stérilisation présent dans cette zone. A ce stade, la stérilisation est réalisée par la chaleur sèche, à une température d'environ 350°C, et un flux d'air laminaire stérile est assuré par des filtres afin d'écarter toutes nouvelles contaminations des flacons. Le tunnel de stérilisation doit donc répondre aux critères d'un environnement maîtrisé de type ZAC classée A, représentée en bleu dans la Figure 1.

La deuxième zone de ce flux de production est appelée bloc. Il est composé d'un ou plusieurs postes de dosage et d'un ou plusieurs postes de bouchage. Les flacons évoluent dans un environnement de type ZAC classée A, représentée en bleu dans la Figure 1, alors que les opérateurs évoluent dans un environnement de type ZAC classée B, représentée en rouge dans la Figure 1, afin d'alimenter la ligne en PA (principe actif) et BC (bouchons) au travers de

gants. La technologie barrière utilisée peut être soit de type *restricted access barrier system* (RABS), soit de type isolateur.

La troisième zone de ce flux de production est appelée conditionnement. Elle débute par le poste de sertissage classée A. Le flacon, une fois bouché et serti, est considéré comme hermétique. Il évoluera alors dans un environnement de type ZAC classée D, représentée en vert dans la Figure 1, sur les postes de lavage, mirage, étiquetage et mise en boîte.

La quatrième et dernière zone qui compose cette unité de production est composée de sas personnel, sas PA et sas ADC. Il s'agit d'évoluer de la ZAC classée D, représentée en vert, vers la ZAC classée C, représentée en orange, puis vers la ZAC classée B, représentée en rouge dans la Figure 1. Pour cela, les opérateurs sont amenés à changer de tenue à chaque étape alors que les ADC et les fûts de PA subiront des décontaminations successives.

2. Suivi environnemental

Afin de répondre au mieux aux exigences réglementaires, un programme de suivi environnemental doit être mis en place. Je m'intéresserai dans la suite de cet exposé uniquement au *monitoring* de la biocontamination.

2.1. Rationnel

Le suivi environnemental doit être conduit sur la base d'un rationnel déterminé par une analyse de risque documentée par l'industriel pharmaceutique. Les points de prélèvement sont définis aux endroits où le produit est exposé à l'environnement, où des manipulations de l'opérateur sont effectuées à proximité du produit, et où le matériel et les surfaces qui seront amenés à être en contact avec le produit sont manipulés. La classification des salles propres aide à établir le niveau de contrôle mais elle n'implique pas que toutes les salles de la même classification aient le même niveau de contrôle avec la même fréquence. Le *monitoring* doit refléter les exigences microbiologiques en fonction de l'activité de la zone (Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments, 2013).

2.2. Moyens de prélèvement

Il existe deux catégories de prélèvements regroupant au total quatre tests indépendants. Pour le prélèvement de l'air, la méthode par impaction et la méthode par sédimentation sont recommandées.

La méthode par impaction ou échantillon volumétrique d'air, présentée en Figure 2, peut quantifier les bactéries et champignons en suspension dans l'air à proximité immédiate du produit.



Figure 2 : Préleveur Air IDEAL (BioMérieux)

Cette méthode d'échantillonnage active peut détecter des suspensions de microorganismes homogènes dans l'air mais n'est pas adéquat pour des contaminations sporadiques qui interviennent au cours de la fabrication.

Les boîtes de sédimentation, quant à elles, peuvent détecter les bactéries et les champignons qui descendent dans la colonne d'air au-dessus de la boîte. Bien que la sensibilité dépende à la fois de la taille de la plaque et de la vitesse de sédimentation des microorganismes, cette technique est la seule méthode qui permette la surveillance en continu des micro-organismes pendant les opérations de fabrication (Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments, 2013).

Pour les prélèvements des surfaces et les empreintes des gants opérateurs, les géloses contacts ainsi que les écouvillons sont recommandés. En effet, la surface des gants est la zone susceptible d'entrer en contact avec la contamination microbienne sur les surfaces de travail, sur les matériaux, ou provenant de l'opérateur lui-même. Elle pourra, ensuite, être transférée au produit lors d'une intervention. C'est pourquoi, l'empreinte des gants, comprenant les cinq doigts doit être réalisée. Cet échantillonnage sera effectué avant la désinfection de routine des gants avec l'alcool, ou avant de changer les gants extérieurs dans les cas où une double paire de gants est utilisée (Microbiological Control and Monitoring of Aseptic Processing Environments, 2013).

2.3. Fréquence de prélèvement

La fréquence de l'échantillonnage dépend du processus de fabrication et de son environnement. Les ZAC utilisées pour assurer une faible biocontamination dans les zones de fabrication de médicament non stérile requièrent un suivi environnemental peu fréquent car celui-ci est non critique. De même, les ZAC dans lesquelles des opérations de fabrication sont conduites dans un système fermé comme par exemple, un bioréacteur, requièrent un nombre de points de prélèvement et une fréquence moindre. En effet, le risque de contamination microbienne du milieu environnant est comparativement faible. *A contrario*, un processus aseptique comme, par exemple, la répartition d'un médicament stérile dans des flacons ou des seringues possède un risque de contamination plus élevé. Le *monitoring* microbiologique appliqué à cette zone sera donc plus important en termes de fréquence et de points de prélèvement de par sa nature critique. Un exemple de fréquence de prélèvement pour le suivi microbiologique d'un site de répartition de vaccin est présenté dans le Tableau 5 (WHO | Environmental Monitoring of Clean Rooms in Vaccine Manufacturing Facilities, 2012).

Tableau 5: Exemple de fréquence de prélèvement pour le suivi microbiologique d'un site de répartition de vaccin (d'après WHO, 2012)

Classification	Volumetric ⁽²⁾	Settle plate ⁽²⁾	Contact plate	Glove print
Grade A (filling operations) ¹	Once per shift	Once per shift	Once per shift	Once per shift
Grade B	Daily	Daily	Daily	Daily
Grade C	Weekly	Weekly	Weekly	N/A
Grade D	Monthly	Monthly	N/A	N/A

Les campagnes de suivi environnemental s'adaptent donc en fonction de la classe de la salle propre ainsi que de la criticité du médicament fabriqué. Pour une zone de classe A où le suivi doit être renforcé, le prélèvement par impaction, les boîtes de sédimentation et les empreintes de gants doivent être réalisés à chaque changement d'équipe. Il est, cependant, laissé à la discrétion du fabricant, le choix du nombre de prélèvement au début, au milieu et à la fin de chaque campagne de production. Par ailleurs, un groupe d'intérêt commun de l'Association pour les Produits Propres et Stériles (A3P) a travaillé en 2016 sur ce sujet afin qu'une révision de l'annexe 1 des euGMP comporte plus de détails sur la surveillance microbiologique des ZAC en accord avec l'ISO 14698-1, notamment pour les fréquences, le moment de réalisation, les durées et le délai entre le prélèvement et la mise en incubation. L'importance des analyses de tendances devrait également être renforcée en complément des spécifications pour chaque classe.

2.4. Exemple d'un plan d'échantillonnage des contrôles microbiologiques d'une ZAC A dans B

Un exemple d'un plan d'échantillonnage des contrôles microbiologiques est présenté en Figure 3. Il s'agit d'un focus sur la partie bloc d'une ligne caractéristique d'un site de production de médicaments stériles injectables possédant une ZAC classée A dans B (cf. Partie I §1.3).

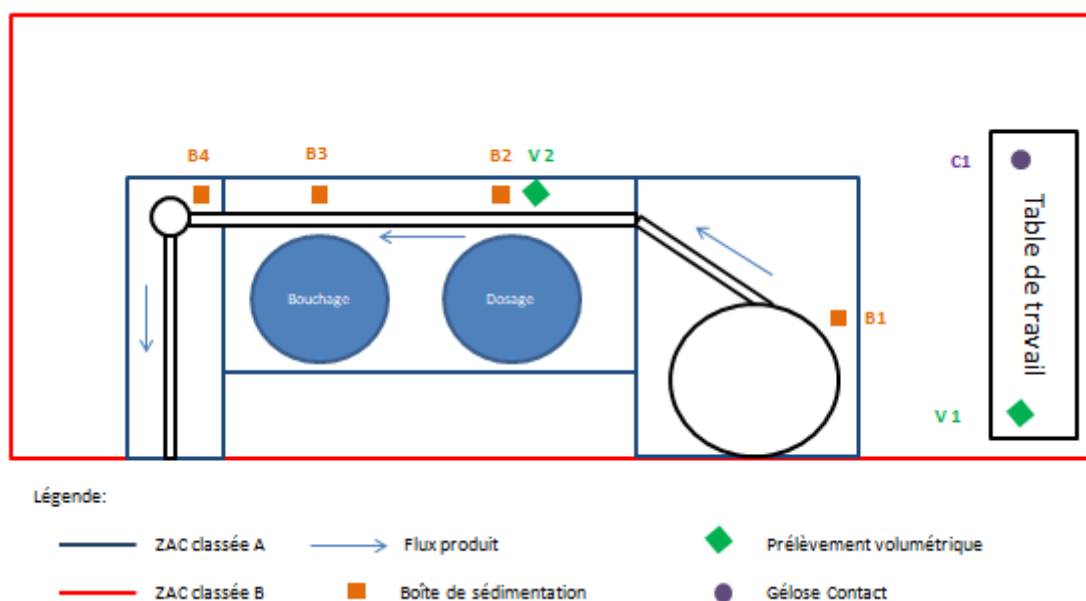


Figure 3 : Exemple d'un plan d'échantillonnage des contrôles microbiologiques

Les contrôles de type boîte de sédimentation, représentés en orange dans la Figure 3, sont répartis dans chaque zone cartérisée classée A. Ils doivent se situés au plus prêt du convoyage des flacons, à hauteur du col de ces derniers et à proximité de chaque activité critique (dosage, bouchage, convoyage) afin de refléter au mieux l'environnement classé A dans lequel évolue les flacons. Ainsi, la boîte B1 sera située à hauteur des flacons sur un support autoclavé sur la zone comportant la table tournante d'accumulation des flacons en sortie de tunnel de stérilisation. La boîte B2 sera située à hauteur des flacons sur un support autoclavé en face des postes de dosage. La boîte B3 sera située à hauteur des flacons sur un support autoclavé en face des postes de bouchage. Enfin, la boîte B4 sera située à hauteur des flacons sur un support autoclavé sur la zone de sortie du bloc. Ces 4 boîtes de sédimentations seront ouvertes en début de chaque lot de médicaments puis remplacées toutes les quatre heures et en fin d'équipe jusqu'à la fin de la répartition de ce lot.

Les contrôles de type prélèvement volumétrique d'air, représentés en vert dans la Figure 3, doivent refléter au mieux les deux environnements de ce bloc. Ils sont donc situés au

niveau des activités critiques de la ZAC classée A ainsi que celles de la ZAC classée B. Ainsi, le prélèvement V1 sera réalisé sur la table de travail de l'opérateur située dans la ZAC classée B. Il est à réaliser une fois par équipe. Le prélèvement V2 sera réalisé en ZAC classée A entre les postes de dosage sur le devant du tapis de convoyage. Il est à réaliser à chaque début d'équipe, au début de chaque lot de médicaments ainsi qu'après chaque remontage.

Les contrôles de type prélèvement volumétrique d'air, représentés en vert dans la Figure 3, permettent d'évaluer la qualité microbiologique de l'air lors des opérations de production. Ils sont donc situés au niveau des activités critiques de la ZAC classée A ainsi que celles de la ZAC classée B. Ainsi, le prélèvement V1 sera réalisé sur la table de travail de l'opérateur située dans la ZAC classée B. Il est à réaliser une fois par équipe. Le prélèvement V2 sera réalisé en ZAC classée A entre les postes de dosage sur le devant du tapis de convoyage. Il est à réaliser à chaque début d'équipe, au début de chaque lot de médicaments ainsi qu'après chaque remontage.

Les contrôles de type gélose contact, représentés en violet dans la Figure 3, permettent d'évaluer la qualité microbiologique des surfaces lors des opérations de production. Ils sont donc situés au niveau des zones d'activités de l'opérateur. Ce dernier n'est pas censé intervenir carters ouverts dans la ZAC classée A lors des opérations de production ; il n'y a donc pas de prélèvement de ce type représenté sur la Figure 3. En revanche, le prélèvement C1 sera réalisé sur la table de travail de l'opérateur située dans la ZAC classée B. Il est à réaliser une fois par équipe et avant tout nettoyage.

Les contrôles de type « empreintes de gants » n'apparaissent pas sur la Figure 3. Ils sont réalisés en classe B sur la table de travail de l'opérateur. Toute personne intervenant dans cette ZAC doit effectuer au minimum un contrôle de gants sur boîte de Pétri avant chaque sortie ou à la fin d'un lot de médicaments ou avant chaque nettoyage.

3. Identification des microorganismes

Il arrive, parfois, que le fait de savoir que le microorganisme soit un coque Gram positif est suffisant. Par exemple, la plus part des coques Gram positif sont issus de la flore commensale de la peau. Les bacilles Gram négatif, quant à eux, ont souvent pour origine une source d'eau. Dans d'autres cas, une identification plus précise est nécessaire afin de comprendre l'origine du microorganisme. La connaissance de l'espèce, par exemple, peut fournir des informations essentielles quant à son origine, son habitat et, par conséquent, la potentielle source de contamination (Microbiological Control and Monitoring of Aseptic

Processing Environnements, 2013). Ainsi, ces caractéristiques aideront à déterminer la cause d'une contamination en répondant à un certain nombre de questions comme : la contamination provient-elle des surfaces en contact avec le produit intermédiaire ?, provient-elle de l'intervention d'un opérateur ?, l'échec du test de stérilité est-il dû à la contamination du produit ou tout simplement à un faux positif ?

Afin de comprendre l'origine d'une contamination microbienne, il est donc recommandé que tout microorganisme prélevé dans la classe A ainsi que dans la classe B entourant immédiatement la classe A soit identifié au niveau de l'espèce (PHSS Technical Monograph No 20 Bio-Contamination, 2014). De même, les colonies représentatives excédant le niveau d'action dans les zones support de classe B et C doivent être identifiées à l'espèce. De plus, dans le cas d'investigations sur la cause racine éventuelle d'un échec de test de stérilité ou de simulation de processus aseptique (*media fill test*), un typage du microorganisme doit être réalisé afin de vérifier si la souche, retrouvée dans l'environnement et le test de stérilité ou le *media fill test*, est identique ou différente. Enfin, tout organisme atypique doit être identifié à l'espèce. Un organisme atypique se définit comme un microorganisme dont la présence dans une zone aseptique de classe B est non désirée. C'est le cas, par exemple, des espèces pathogènes, des bacilles Gram négatif ou encore des moisissures. Pour rappel, aucun microorganisme ne doit être présent dans une zone classée A. Dans le cas contraire, une investigation systématique est alors obligatoire. En outre, l'analyse des tendances microbiennes peut mettre en évidence un potentiel problème émergeant dans l'environnement de la salle propre telle que la réduction de l'efficacité du nettoyage ou de la désinfection par exemple.

Les méthodes d'identification des champignons filamenteux, organismes atypiques par définition, seront développées dans la Partie III de ce manuscrit.

4. Synthèse

Le suivi environnemental réalisé sur un site de production pharmaceutique, comportant des ZAC, engendre un nombre considérable d'échantillons que le laboratoire de contrôle qualité doit analyser en parallèle de ces nombreuses autres activités (études de stabilité, identifications, recherche de potentielles impuretés, tests de stérilité par exemple). De plus, la réglementation exige dans de nombreux cas qu'une identification à l'espèce des microorganismes rencontrés soit réalisée. Ces résultats seront essentiels lors de la revue du dossier de lot du médicament stérile afin de statuer sur la libération de ce produit fini.

Alors que l'identification à l'espèce des bactéries est aujourd'hui largement maîtrisée, celle des champignons filamenteux reste périlleuse. Or, dans le cadre d'une contamination de la ZAC classée A par un champignon filamenteux, il n'est plus acceptable d'identifier ce microorganisme par l'appellation générique « moisissure » : une identification au minimum au genre est dorénavant demandée par les inspecteurs de l'ANSM.

Dans la suite de ce manuscrit, je me suis donc intéressé plus particulièrement aux champignons filamenteux. En effet, cette catégorie de microorganismes n'a, jusqu'à présent, pas - ou très peu - été décrite dans ce contexte de l'environnement industriel pharmaceutique que ce soit dans la littérature scientifique ou dans les référentiels réglementaires. Mon travail a donc consisté à réaliser un état des lieux des genres de champignons filamenteux les plus fréquemment retrouvés dans l'industrie pharmaceutique.

Partie II : Champignons filamenteux et environnement industriel pharmaceutique

1. Champignons filamenteux

1.1. Définitions

Les champignons, également appelés mycètes, sont des organismes eucaryotes uni- ou pluricellulaires incluant des espèces macroscopiques, également appelées « macromycètes », et microscopiques, appelées « micromycètes », d'aspect filamenteux ou levuriforme. C'est à ce second groupe qu'appartiennent les moisissures et les levures, qui peuvent se révéler pathogènes pour l'Homme, détériorer la qualité des médicaments mais qui s'avèrent aussi être indispensables pour produire certains ingrédients pharmaceutiques actifs. En effet, à la différence du métabolisme primaire qui intervient directement dans les processus vitaux tels que la reproduction et la croissance, le métabolisme secondaire est impliqué dans des stratégies de survie et de communication qui permettent aux champignons de s'adapter à leur environnement en produisant de très grandes variétés de métabolites secondaires, également appelés aujourd'hui métabolites spécialisés (Garon et *al.*, 2015). A titre d'exemple, l'industrie pharmaceutique utilise certaines moisissures pour la synthèse de médicaments comme la pénicilline, un antibiotique produit à partir de *Penicillium chrysogenum*, la griséofulvine, un antifongique produit à partir de *Penicillium griseofulvum*, la lovastatine, un hypolipidémiant produit à partir d'*Aspergillus terreus* ou encore des facteurs de croissance tels que l'érythropoéitine (EPO) ainsi que des hormones telles que l'insuline produits selon la technique de l'ADN recombinant à l'aide de levures (Garon et *al.*, 2015).

Les champignons filamenteux peuvent devenir visibles lorsque leur développement est important. Le terme « moisissure » est couramment utilisé pour désigner les champignons filamenteux microscopiques. Ils sont dépourvus de chlorophylle et sont donc qualifiés d'organismes hétérotrophes. Ainsi, une source de carbone est nécessaire à leur développement. Les champignons se nourrissent par absorption des matières organiques ou minérales et sont donc qualifiés d'organismes absorbotrophes. Enfin, les champignons filamenteux sont ubiquistes et généralement saprotrophes, même si certaines espèces peuvent également se révéler pathogènes voire opportunistes.

1.2. Caractéristiques morphologiques générales

Les champignons filamenteux sont des organismes dont l'appareil végétatif est appelé thalle. Le thalle fongique est formé d'un enchevêtrement de filaments tubulaires de 2 à 10 µm de diamètre, également connus sous le terme d'hyphes. Ces hyphes comprennent les organites

classiques d'une cellule : noyau, mitochondrie, cytoplasme et vésicules. Ils peuvent être coenocytiques, c'est-à-dire non cloisonnés, ou septés, comprendre cloisonnés, et leur enchevêtrement forme le mycélium (Figure 4). Les champignons coenocytiques sont également connus sous le nom de « champignons inférieurs » et les champignons septés sous le nom de « champignons supérieurs ».

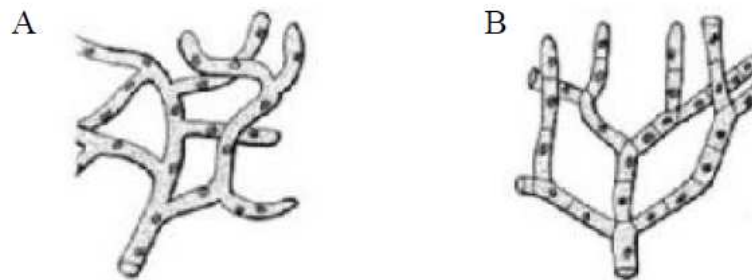


Figure 4 : Structure de l'hyphe. (A) Hyphe coenocytique. (B) Hyphe septée. (Roland, Roland, and El Maarouf-Bouteau 2008)

Les champignons filamenteux possèdent une paroi constituée essentiellement de polysaccharides, de glycoprotéines et de mannoprotéines (Figure 5).

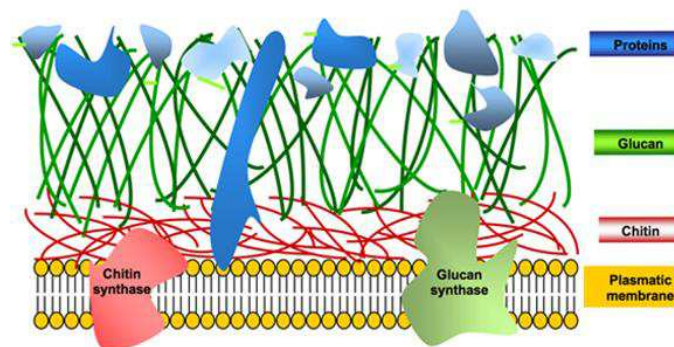


Figure 5 : Schéma de la structure de la paroi fongique (Lecellier 2013)

Parmi les polysaccharides, la chitine et les glucanes sont les deux molécules majoritairement observées. La chitine est un polymère de molécules de N-acétylglucosamine liées entre elles par une liaison de type β -1,4. Les glucanes sont des polymères de molécules de D-glucose liées entre elles par des liaisons β (Bowman et Free, 2006). Leur fonction est d'assurer la protection des moisissures vis-à-vis des agressions du milieu extérieur. La chitine joue également un rôle dans la rigidité de la paroi cellulaire. Les glycoprotéines jouent, quant à elles, un rôle dans l'adhérence. Enfin, les mannoprotéines forment une matrice autour de la paroi (Bouchet et *al.*, 2005).

1.3. Classification

Différents rangs taxonomiques sont utilisés pour la classification des êtres vivants. Ces rangs hiérarchiques sont : le règne, la division, également appelée embranchement ou phylum, la classe, l'ordre, la famille, le genre et l'espèce. Il existe des rangs intermédiaires comme, par exemples, la sous-division, la sous-famille, le sous-genre ou la sous-espèce. La nomenclature binomiale est utilisée pour déterminer le nom scientifique des espèces. Elle fait référence au genre et à l'espèce. Cette nomenclature suit les règles énoncées par le naturaliste Carl Von Linné en 1753.

Linné propose une première classification du monde vivant répartie en deux groupes : les plantes d'une part, et les animaux, d'autre part (Linné, 1735). Cette classification traditionnelle, établie en fonction d'un simple critère de ressemblance, plaçait les champignons dans le groupe des végétaux. Elle a évolué progressivement au cours des années pour atteindre cinq règnes du vivant et placer, ainsi, les champignons dans un règne à part chez les Eucaryotes, plus proche du règne des animaux que celui des végétaux (Whittaker, 1969).

La constitution de six règnes du vivant, basée sur l'analyse des séquences d'ARN ribosomique et répartie en trois domaines - (1) les Archéobactéries, (2) les Eubactéries et (3) les Eucaryotes - a, ensuite, été proposée (Woese et Fox, 1977). Cette classification des organismes vivants a, enfin, été révisée et modifiée sur la base de la génomique pour obtenir, aujourd'hui, un consensus sur deux empires : (1) les Procaryotes d'une part et (2) les Eucaryotes d'autre part (Cavalier-Smith, 1998 ; Ruggiero et *al.*, 2015). Cette révision a permis l'exclusion d'un groupe d'organisme fongiforme, nommé oomycètes, du règne fongique donnant lieu à la redéfinition des champignons vrais (Baldauf, 2003). Une classification phylogénétique des Eucaryotes est présentée Figure 6.

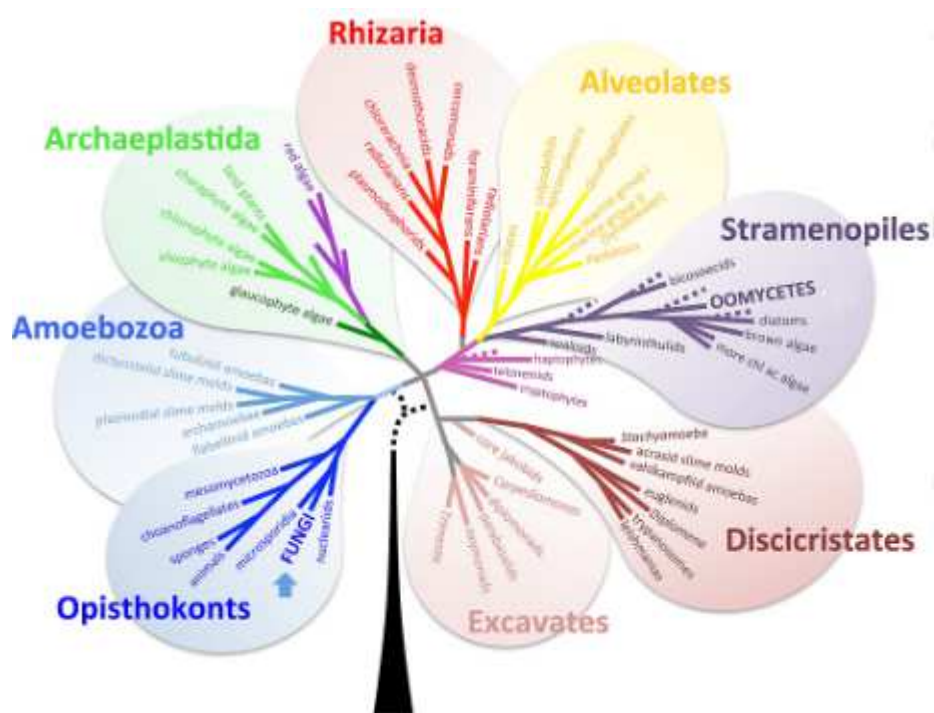


Figure 6 : The Eucaryotes tree of life (adapté d'après S. L. Baldauf 2003)

Ainsi, les champignons représentent, aujourd'hui, un règne à part au sein des Eucaryotes, bien distinct du règne des animaux et de celui des plantes auquel ils appartenaient autrefois. Les classifications les plus récentes font apparaître les *Fungi* ou champignons vrais, encore appelés Eumycètes dans un groupe particulier des Eucaryotes, celui des Opisthocontes (Adl et *al.*, 2005 ; Simpson et Roger, 2004 ; Baldauf, 2003). La Figure 7 présente les grands groupes du règne des Eumycètes.

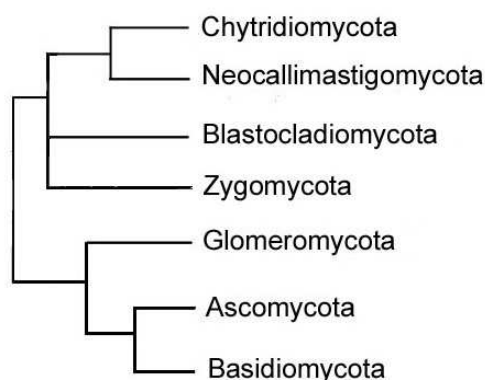


Figure 7: Les grands groupes des Eumycètes (adapté d'après Hibbett et al. 2007)

On y retrouve les quatre divisions ou embranchements principaux. Les Chytridiomycètes représentent les champignons archaïques qui auraient gardés un stade flagellé. L'ensemble, anciennement connu sous le nom des Zygomycètes, correspond à des

champignons inférieurs. Au contraire, les Ascomycètes et les Basidiomycètes, regroupés aujourd'hui dans le sous-règne des Dikaria, représentent les champignons les plus évolués. La distinction entre les Zygomycètes, Ascomycètes et Basidiomycètes repose également sur leur mode de reproduction sexuée produisant respectivement des zygospores, ascospores ou basidiospores.

D'une manière générale, deux modes de reproduction peuvent être observés dans le cycle de vie d'un champignon : la reproduction sexuée et la multiplication végétative (asexuée). La Figure 8 illustre le cycle de vie d'une espèce d'ascomycète, *Eurotium rubrum*, qui a la particularité de posséder ces deux modes de reproduction.

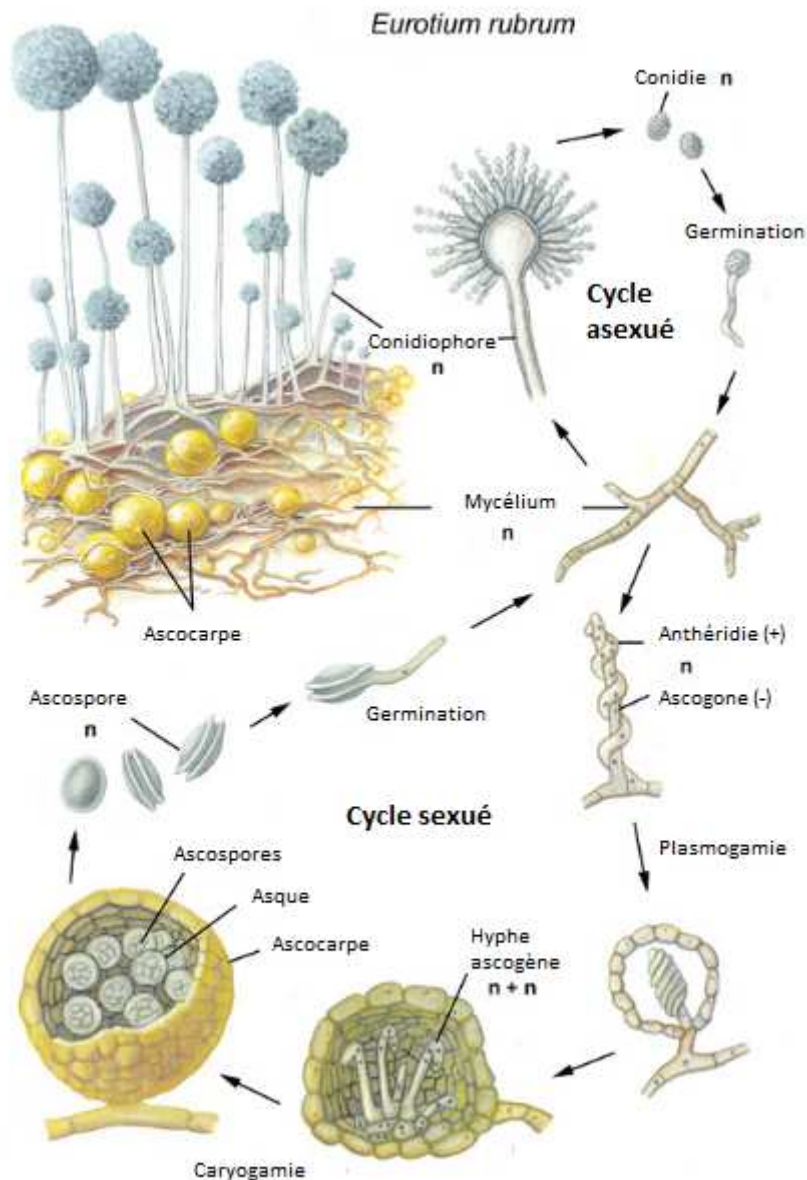


Figure 8 : Cycle de vie de l'espèce *Eutotium rubrum* (adapté d'après Sosa 2015)

Pour cette espèce, le cycle asexué repose sur la dispersion des conidies permettant la propagation du champignon dans l'environnement. Ces conidies sont produites en grande quantité et en continu par des structures spécialisées appelées phialides supportées par des conidiophores développées à partir du mycélium. Elles se détachent et sont dispersées soit par l'air, soit par un insecte ou par l'eau, par exemples. Après propagation, les conidies peuvent rester inertes ou alors, dans des conditions environnementales favorables, germer et émettre un nouveau mycélium. Cette forme asexuée est caractéristique du genre *Aspergillus*, genre qui sera présenté dans la suite du manuscrit (cf. paragraphe 4.1 page 44).

Le cycle sexué se décompose en plusieurs étapes. Deux ascospores de polarité différente germent et émettent un mycélium à n chromosomes. Lorsque ces deux mycéliums se rencontrent, la fusion des cytoplasmes, appelée plasmogamie, donne naissance à un nouveau mycélium à $2n$ chromosomes (à noter que ce dernier peut également provenir de la fusion de deux mycéliums provenant du cycle végétatif, c'est-à-dire suite à la germination des conidies). Il y a donc naissance d'hyphes ascogènes à 2 noyaux par cellule et très rapidement, l'extrémité de l'hyphe pour former des asques. C'est à cet endroit qu'a lieu la fusion des noyaux, appelée caryogamie, suivie d'une division immédiate, ce qui va engendrer la formation d'ascospores à polarité différente. Les asques chez *Eurotium rubrum* sont contenues dans des structures sphériques sexuelles appelées cléistothèces.

Ces deux modes de reproduction aboutissent à deux formes morphologiquement différentes de champignons : les téléomorphes (formes sexuées) avec la production de cléistothèces correspondant au genre *Eurotium* et les anamorphes (formes asexuées) avec la formation de conidiophores caractéristiques des *Aspergillus*. Les cycles de reproduction sexué et asexué sont étroitement liés dans le cas de cette espèce mais dans la nature, certains champignons ne sont observables que sous l'une des deux formes (sexuée ou végétative).

La classification des Eumycètes a été construite sur la base de leur mode de reproduction sexuée. De ce fait, certains champignons, dont le mode de reproduction sexuée était inconnu et pour lesquels seule la multiplication végétative était observée, ont longtemps été classés dans les Deutéromycètes (ou champignons imparfaits) et ne rentraient pas dans les Eumycètes. C'est le cas, par exemple, d'espèces appartenant à des genres importants tels que *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Trichoderma*, etc. Toutefois, avec l'avènement de la biologie moléculaire, le nombre d'espèces présentes dans ce groupe a tendance à diminuer. En effet, de nombreux champignons anamorphes, dont les formes sexuées sont maintenant connues, sont reclassés notamment dans le sous-embranchement des Ascomycètes.

Ainsi, un même champignon peut présenter deux modes de reproduction distincts, sexuée et végétative, sans passage d'un stade à l'autre dans le cycle de vie comme c'est le cas par exemple pour *Eurotium rubrum*. C'est pourquoi un même champignon peut avoir deux noms différents car les formes sexuée et végétative, de morphologies différentes, ont été décrites séparément (sporophores produisant des asques et ascospores pour la forme sexuée et conidiophores produisant des conidies pour la forme végétative). On pourra citer comme exemple le genre *Davidiella* qui est maintenant considéré comme étant le téléomorphe du genre *Cladosporium*, le genre *Neosporia* (et *Eurotium*) à celui du genre *Aspergillus* ou encore

le genre *Talaromyces* à celui du genre *Penicillium*. C'est là, toute la difficulté d'identification et de classification du règne fongique.

2. Sources de contamination et de dissémination fongique en environnement industriel pharmaceutique

En environnement industriel pharmaceutique, les champignons filamenteux sont ubiquitaires et peuvent être retrouvés dans l'air, l'eau, les sols ou encore les matières premières. Ils se propagent par l'intermédiaire des spores. Celles-ci peuvent être végétatives, on parle alors de conidies, et/ou sexuées, on parle alors d'ascospores, basidiospores ou zygospores. Le diamètre de ces corpuscules peut atteindre 2 à 250 μm ce qui leur permet d'être facilement mis en suspension dans l'air et transportés sur de grandes distances (Botton et *al.*, 1990). Lorsque les conditions d'humidité et de température sont favorables, les spores germent.

Les sources de contamination dans l'industrie pharmaceutique peuvent être répertoriées selon cinq grandes catégories : (1) le milieu, (2) le matériel, (3) la main d'œuvre, (4) la méthode et (5) les matières. Un diagramme d'Ishikawa a été réalisé et est présenté Figure 9.

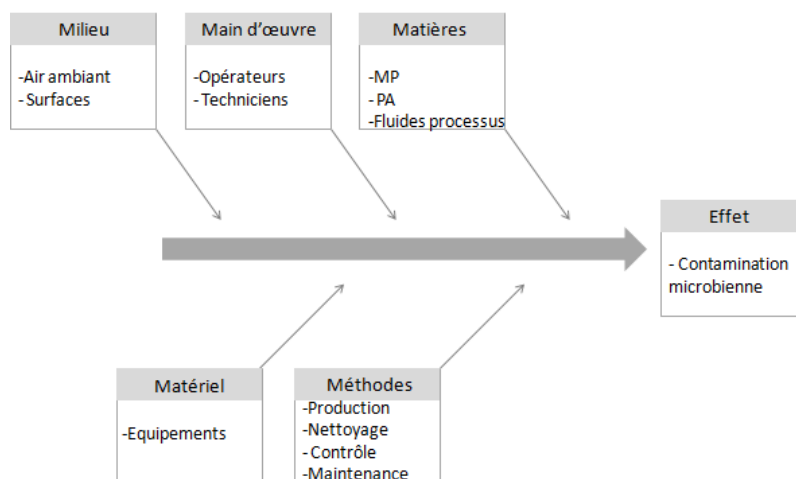


Figure 9 : Diagramme d'Ishikawa des sources potentielles de contamination microbienne

2.1. Milieu

L'air est un vecteur de microorganismes ayant pour origine soit l'homme, par sa propre flore ou par ses activités, soit l'environnement interne ou externe au site de production. Le taux de contamination de l'environnement externe varie en fonction des saisons, du climat et de la localisation géographique par exemples. Les communautés fongiques urbaines

seraient assez homogènes avec des champignons appartenant principalement aux genres *Aspergillus* et *Penicillium* (Botton et al., 1990). Cette observation pourrait être associée à l'effet toxique des polluants atmosphériques sur la diversité fongique. Les communautés rurales, quant à elles, sont plus variées avec la présence également de champignons appartenant aux genres *Alternaria*, *Cladosporium* ou encore *Fusarium* (Botton et al., 1990). Le taux maximum de spores fongiques peut être évalué entre 1000 et 2000 spores revivifiables par mètre-cube d'air (Botton et al., 1990). Ainsi, les populations fongiques retrouvées dans un site de production situé en milieu rural seront différentes de celles retrouvées sur un site en milieu urbain.

Concernant l'environnement interne au site industriel, les microorganismes observés peuvent être véhiculés par un certain nombre d'éléments comme les poussières, les déchets tissulaires, les poils, les particules issues de la desquamation de la peau, les gouttelettes de Pflügge, etc. Ce sont des particules dont le diamètre est compris entre 5 et 20 μm de diamètre. Selon leur composition, elles peuvent favoriser la survie ou même la multiplication des microorganismes fixés.

Les surfaces régulièrement en contact manuel tels que les poignées, les stylos, les téléphones, par exemple, peuvent devenir une source importante de biocontamination.

2.2. Matériel

Le matériel, utilisé en production, contrôle, nettoyage et maintenance, peut également être un vecteur relais de contamination. Un certain nombre de causes racines peut être répertorié ici comme une utilisation inadaptée, un défaut de nettoyage ou de décontamination, un filtre *High Efficiency Particulate Air* (HEPA) défectueux, etc. Par exemple, une fuite, aussi minime soit-elle, associée à une température élevée dans la zone technique peut, très rapidement, aboutir au développement d'un champignon. Si, un filtre à air non intègre vient s'ajouter à ces deux premiers éléments, ce champignon pourra venir contaminer la ZAC. Ce type de contamination nécessite, certes, plusieurs facteurs dégradés ($T^{\circ}\text{C}$ élevée, fuite de la boucle d'eau et filtre non intègre) mais cet exemple montre bien l'importance de la maintenance et du suivi préventif des équipements.

2.3. Main d'œuvre

L'homme, par sa respiration, la desquamation de sa peau, la perte de cheveux ou de cils, ses vêtements, ses gestes et déplacements ainsi que ses bijoux et/ou le maquillage est une

source de contamination particulière et microbienne importante. Il est naturellement porteur de microorganismes, qui sont généralement des germes saprotrophes n'entraînant aucune infection. En revanche, sur un site de production pharmaceutique, les microorganismes portés par le personnel peuvent être responsables de la biocontamination des ZAC. Deux types de contamination peuvent être distingués : (1) la contamination résidente, naturellement présente sur la peau, non pathogène et stable, et (2) la contamination transportée, provenant de l'environnement et éventuellement pathogène. L'homme est alors à la fois émetteur et vecteur de cette biocontamination ce qui lui vaut le statut de principale source de contamination (PHSS Technical Monograph No 20 Bio-Contamination, 2014).

2.4. Méthode

Les méthodes, qu'elles soient de production, maintenance, nettoyage, contrôle et transfert, peuvent être responsables de contaminations si elles ne sont pas adaptées, précises et rigoureusement suivies.

2.5. Matière

Les matières regroupent les matières premières solides, comme les principes actifs, les excipients, les articles de conditionnement et les fluides, comme les installations de distribution d'eau, d'air comprimé ou d'azote. Ces derniers peuvent véhiculer une contamination microbienne importante. La présence de bras mort dans le circuit de canalisation, la prolifération au niveau des joints ou encore la présence d'aspérités dans les canalisations en sont à l'origine (Botton et *al.*, 1990).

2.6. Synthèse

Ainsi, tout au long du processus de fabrication, un microorganisme présent à l'état de trace au départ peut trouver, dans le produit fini, des conditions favorables à son développement (Botton et *al.*, 1990). De plus, la colonisation des produits et matériaux ainsi que la sporulation sont des moyens très efficaces pour la dissémination d'une espèce fongique. C'est pourquoi, dans le cadre d'une contamination fongique, des investigations doivent être menées afin de déterminer la source potentielle de cette dernière. L'utilisation de l'outil présenté dans cette partie, à savoir, le diagramme d'Ichikawa, également appelé « méthode des 5M », apparaît comme essentielle pour la compréhension du processus de contamination. Enfin, l'identification des diverses espèces rencontrées constitue également

une étape primordiale dans ce processus d'investigation (PHSS Technical Monograph No 20 Bio-Contamination, 2014).

3. Impact des moisissures en environnement industriel pharmaceutique

Un champignon filamenteux, de par sa croissance, la production de métabolites et/ou son pouvoir infectieux, peut entraîner des risques. Il existe deux principaux risques à la suite d'une contamination dans la zone de production. D'une part, la qualité du médicament pourrait être impactée et, d'autre part, la sécurité et/ou la santé du patient, à qui le médicament serait administré, pourrait être impactée.

3.1. Impacts sur l'environnement et/ou la qualité du produit fini

Les champignons filamenteux sont connus dans l'industrie agroalimentaire pour entraîner des dégradations telles que des altérations d'aspect de surface, mais également des altérations organoleptiques et des modifications chimiques telles que le pH par exemple (Delacharlerie, 2008). Ces dégradations s'expliquent par la capacité que possède le champignon filamenteux à sécréter des métabolites et notamment des enzymes de type hydrolytique telles que les amylases, les protéases, les lipases et les cellulases, par exemple, assurant l'assimilation des matières nutritives et/ou lipolytiques, capables d'altérer les matières grasses. Certaines enzymes sont également capables de dégrader l'environnement sur lequel le champignon filamenteux se développe comme la cellulose du bois ou les toiles de coton avec *Trichoderma reesei* et sa batterie d'enzyme de type cellulases par exemple (Henrissat, 2008). On peut donc se poser la question de l'impact que pourrait avoir le développement d'un champignon filamenteux s'il possédait les mêmes propriétés dans l'environnement industriel pharmaceutique. La dégradation de matériaux pourrait générer des particules d'origine process qui, si elles se situaient à proximité directe de la zone de dosage/bouchage du médicament injectable, pourraient se retrouver à l'intérieur du flacon.

Les effets cliniques les plus couramment observés lors de l'injection accidentelle de particules sont l'occlusion, la thrombose, la phlébite, l'embolie, l'inflammation, les granulomes, les fibroses ou enfin la mort dans les cas les plus extrêmes (Langille, 2013). Ce risque de dégradation de l'environnement est limité grâce à un certain nombre de mesures. Les matériaux utilisés dans la conception d'une ZAC sont notamment inertes. L'un des plus connus est sans doute l'inox 316L. En revanche, une des portes d'entrée de cette contamination est l'environnement, et notamment le vecteur air, avec les différents emballages des PA et ADC comme les cartons et les palettes en bois qui peuvent contenir des

spores par exemple. Un certain nombre de mesures sont prises, telles que le traitement de l'air, les cascades de pression, afin de réduire ce risque.

Enfin, les champignons filamenteux sont notamment connus pour leur capacité à dégrader les matériaux à base de produits cellulotiques mais nous ne connaissons pas l'impact du développement d'un champignon sur toutes les MP rentrant dans la composition d'un médicament injectable. Cette MP pourrait s'avérer un bon substrat. Outre les dégradations organoleptiques déjà observées dans l'industrie agroalimentaire, les conséquences d'une dégradation d'une MP pourraient être une diminution du dosage du médicament le rendant ainsi moins actif voire inactif ou une augmentation des impuretés pouvant avoir un impact sur la santé du patient. Des normes concernant la présence d'impuretés et de substances apparentées dans le médicament sont clairement décrites dans la monographie générale 2034, « Substances pour usage pharmaceutique », et dans le chapitre général 5.10., « Contrôle des impuretés dans les substances pour usage pharmaceutique », de la Pharmacopée Européenne.

3.2. Impacts sur la sécurité du patient

Concernant la sécurité du patient, le médicament contaminé directement, *via* un champignon pathogène, ou indirectement, *via* des métabolites toxiques, peut provoquer des effets nocifs et, ainsi, nuire à la santé du patient. En effet, les moisissures peuvent, selon les espèces, les souches et l'environnement, générer des métabolites toxiques, tels que les mycotoxines, et des métabolites primaires tels que les composés organiques volatils (COV) défavorables.

Le terme mycotoxine dérive du grec « *mycos* », signifiant « champignon » et du latin « *toxicum* », signifiant « poison ». Pitt les a d'ailleurs définis comme des « métabolites de champignons qui, lorsqu'ils sont ingérés, inhalés ou absorbés par la peau, altèrent les capacités de réaction et provoquent des maladies ou la mort chez l'homme ou l'animal » (Pitt, 2000). Ainsi, il s'avère que ces molécules sont capables d'induire un effet toxique à de faibles concentrations (Reboux, 2006). Les mycotoxines sont des métabolites secondaires (ou spécialisés) et leur nombre est estimé à environ 400 (Etzel, 2002; Elidemir et *al.*, 1999). Ils sont présents dans le mycélium et les conidies. Leur structure chimique leur permet d'être stables et en particulier thermostables (Bullerman et Bianchini, 2007). Cette caractéristique empêche donc leur dégradation par une stérilisation terminale, technique très répandue dans l'industrie du médicament stérile lorsque le PA n'est pas thermosensible. Parmi les centaines de mycotoxines identifiées à l'heure actuelle, une trentaine est véritablement importante pour

la santé humaine en raison de leur fréquence ou de leur toxicité (Bennett et Klich, 2003). De nombreux genres de moisissures sont connus comme étant producteurs de mycotoxines. Cependant, les mycotoxines potentiellement dangereuses pour l'homme, présentées dans les Tableaux 6 et 7, sont produites par des souches fongiques appartenant aux genres *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium* (AFSSA, 2009).

Tableau 6 : Mycotoxines réglementées et moisissures productrices associées (adapté d'après AFSSA, 2009)

Mycotoxines	Principales moisissures productrices
Aflatoxines B1, B2, G1, G2	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> , <i>A. nomius</i>
Ochratoxine A	<i>Penicillium verrucosum</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>A. carbonarius</i>
Patuline	<i>Penicillium expansum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>Byssosclamyces nivea</i>
Fumonisines B1, B2, B3	<i>Fusarium verticillioides</i> , <i>F. proliferatum</i>
Trichotécènes (groupes A et B)	<i>Fusarium langsethiae</i> , <i>F. sporotrichioides</i> , <i>F. poae</i> , <i>F. graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i> , <i>F. tricinctum</i> , <i>F. acuminatum</i>
Zéaralène	<i>Fusarium graminearum</i> , <i>F. culmorum</i> , <i>F. crookwellense</i>

Tableau 7 : Mycotoxines non réglementées et moisissures productrices associées (adapté d'après AFSSA, 2009)

Mycotoxines	Principales moisissures productrices
Citrinine	<i>Aspergillus terreus</i> , <i>A. carneus</i> , <i>A. niger</i> <i>Penicillium verrucosum</i> , <i>P. citrinum</i> , <i>P. expansum</i>
Toxines d' <i>Alternaria</i> (alternariol, alternariol méthyl éther...)	<i>Alternaria alternata</i> , <i>A. solani</i>
Acide cyclopiazonique	<i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. tamarii</i> , <i>Penicillium</i> dont <i>P. camemberti</i>
Stérigmatocystine	<i>Aspergillus nidulans</i> , <i>A. versicolor</i> , <i>A. flavus</i>
Sporidesmines	<i>Phoma</i> <i>chartarum</i>
Stachybotryotoxines	<i>Stachybotrys chartarum</i>
Toxines d'endophytes (ergovaline, lolitrem B)	<i>Neotyphodium coenophialum</i> , <i>N. lolii</i>
Phomopsines	<i>Phoma</i> <i>leptostromiformis</i>
Toxines trémorgènes	<i>Penicillium roquefortii</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. puberulum</i> , <i>Aspergillus clavatus</i> , <i>A. fumigatus</i>

Une même espèce peut produire plusieurs sortes de mycotoxines selon les conditions de culture. C'est le cas par exemple de l'espèce *Penicillium verrucosum* qui produit à la fois

l'ochratoxine A et la citrinine. A l'inverse, une même mycotoxine peut être produite par plusieurs espèces fongiques différentes. C'est le cas par exemple de l'aflatoxine B1 qui est produite par les espèces *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* et *A. nomius*. La patuline est même produite par trois genres de champignons différents, à savoir, *Penicillium* (*P. expansum*), *Aspergillus* (*A. clavatus*) et *Byssoschlamys* (*B. nivea*). Les effets liés aux mycotoxines sont attribués à la présence de double liaison C=C jouant un rôle dans la toxicité et les propriétés cancérogènes des mycotoxines en formant des adduits à l'ADN (Bennett et Klich, 2003). Le Tableau 8 présente les effets liés aux principales mycotoxines.

Tableau 8 : Effets des principales mycotoxines chez l'Homme (adapté d'après AFFSA, 2009)

Toxine	Effets
Aflatoxine B1 + M1	Hépatotoxicité Génotoxicité Cancérogénicité Immunomodulation
Ochratoxine A	Néphrotoxicité Génotoxicité Immunomodulation
Patuline	Neurotoxicité Mutagenèse <i>in vitro</i>
Trichothécènes (groupes A et B)	Hématotoxicité Immunomodulation Toxicité cutanée
Zéaralène	Fertilité et reproduction
Fumonisine B1	Lésion du système nerveux central Hépatotoxicité Génotoxicité Immunomodulation

Les effets toxiques induits par les mycotoxines sont de nature variée. Certaines d'entre elles exercent un pouvoir hépatotoxique comme par exemple les aflatoxines. Liu a démontré que ces dernières peuvent multiplier par 5 le risque de développer un cancer hépatique (Liu et al., 2012). D'autres se révèlent œstrogéniques comme la zéaralène et induisent des problèmes au niveau de la fertilité et de la reproduction. Les mycotoxines telles que la patuline, les trichothécènes ou encore les fumonisines se révèlent immunotoxiques et hématotoxiques. L'ochratoxine A, produite par *Aspergillus ochraceus* présente une activité néphrotoxique et les toxines trémorgènes sont considérées comme neurotoxiques. Certaines mycotoxines sont reconnues ou suspectées d'être cancérogènes comme l'aflatoxine B1 par exemple (AFSSA, 2009).

Les composés organiques volatils (COV) sont des composés produits lors du métabolisme primaire des moisissures. Ils sont appelés dans la littérature *microbial volatile organic compounds* (MCOV) et appartiennent à différentes familles chimiques comme les alcools, les cétones, les éthers, les esters, les terpènes par exemples. Ils sont, par ailleurs, responsables de l'odeur caractéristique associée aux moisissures permettant la détection d'une contamination non visible à l'œil nu. Ils pourraient être à l'origine d'irritations au niveau des zones corporelles pouvant être en contact avec ces composés, à savoir, les muqueuses oculaires, nasales, cutanées et respiratoires (Casset et De Blay, 2008).

D'autres éléments des parois, des spores et/ou des mycéliums peuvent entraîner des réactions de type allergique. Les protéines allergisantes, par exemple, peuvent activer ou exacerber des réactions allergiques de type I (IgE dépendantes) ou de type III (IgG dépendantes). Les genres *Cladosporium*, *Alternaria*, *Penicillium* et *Aspergillus* seraient fréquemment associés aux allergies et aggraveraient des pathologies de type rhinite ou asthme (Bush et Prochnau, 2004 ; Frew, 2004 ; Smit et *al.*, 2011). Les (1,3)- β -D glucanes, polysaccharides composant la paroi de la cellule fongique interviendraient dans un processus inflammatoire. Leur action pro-inflammatoire exacerberait les signes cliniques au niveau respiratoire (Young et Castranova, 2005). Concernant les pathologies infectieuses, un certain nombre a été décrit chez l'Homme et touche principalement l'appareil respiratoire. Ainsi, l'espèce *Aspergillus fumigatus*, par exemple, produit des spores de petite taille (2 à 3 μ m) ce qui les rend très invasives. (Bouchet et *al.*, 2005). Elle est, par ailleurs, capable de résister aux 37°C du corps humain. Dans des conditions cliniques favorables, comme les patients fortement immunodéprimés par exemple, cette espèce peut provoquer des aspergilloses pulmonaires invasives très souvent mortelles. Elle représente la pathologie la plus fréquente et la plus grave due à ces champignons (Grandière-Perez et *al.*, 2002 ; Paugam et *al.*, 2010 ; Tabone, 2003).

4. Moisissures principalement observées dans l'environnement industriel pharmaceutique

En 2014, la société Eurofins IDmyk, spécialisée dans l'identification des microorganismes, a publié le « top 30 » des genres de champignons rencontrés dans les industries pharmaceutiques (Figure 10).

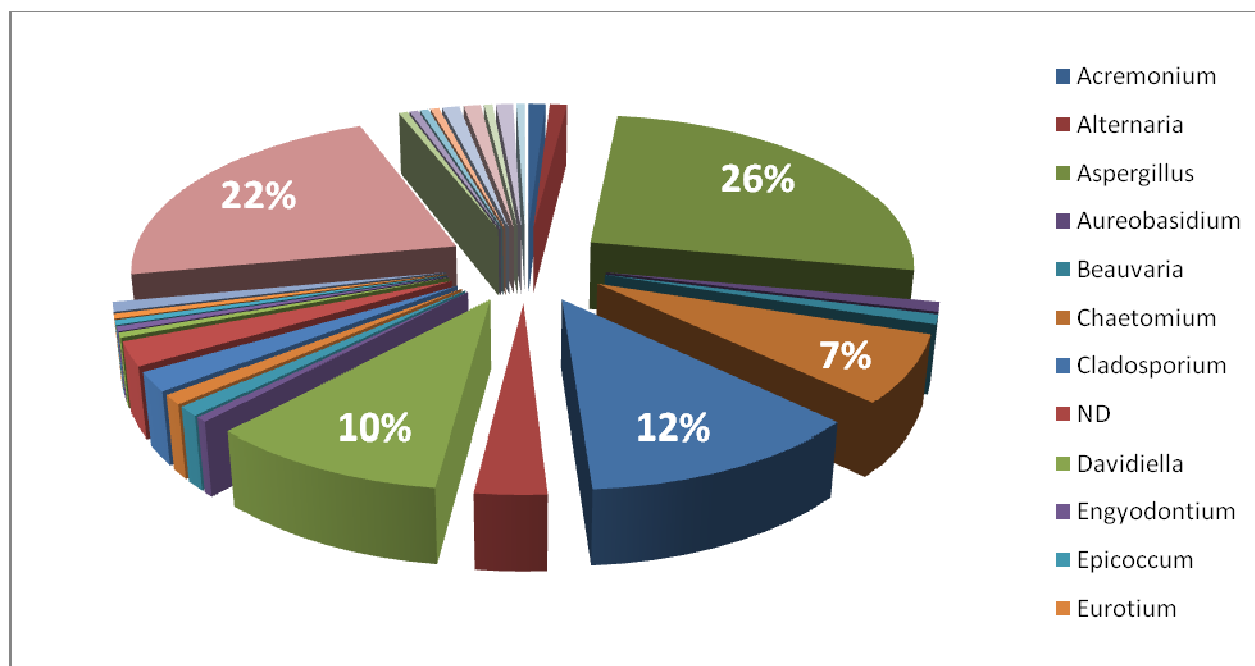


Figure 10 : Principaux genres de champignons rencontrés dans les industries pharmaceutiques (Carlotti, 2014)

D'après cette étude basée sur plus de 1200 identifications moléculaires réalisées par séquençage multilocus, 4% des moisissures rencontrées dans l'environnement des industries pharmaceutiques sont des champignons inférieurs et 96% sont des champignons supérieurs. Parmi eux, les genres les plus fréquemment rencontrés sont au nombre de trois et représentent à eux seuls près de 70% des moisissures. Il s'agit du genre *Aspergillus* à hauteur de 26%, du genre *Cladosporium* à hauteur de 22% et du genre *Penicillium* à hauteur de 22% (Carlotti, 2014). Ces trois genres - *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium* - appartiennent au groupe des Ascomycètes.

Or, ces derniers sont particulièrement importants car ils sont potentiellement producteurs de mycotoxines et/ou substances pathogènes pour la santé de l'Homme et de substances délétères pour la qualité du médicament produit (cf.

Impact des moisissures, page 38). Dans le cadre de ce travail et dans la suite du manuscrit, nous nous intéresserons plus particulièrement à ces trois genres de moisissures.

4.1. Le genre *Aspergillus*

4.1.1. Historique

Les *Aspergillus* représentent avec les *Penicillium* l'un des plus grands groupes de champignons filamenteux. Il n'existe que très peu d'habitats totalement dépourvus d'*Aspergillus*. Décrit par Michelli en 1729, le genre *Aspergillus* trouve son nom de sa ressemblance avec le goupillon – *aspergillus* en latin - dont on se servait à l'église à cette époque. Il est décrit par Link en 1809 comme « *Thallus e floccis caespitosis, septatis, simplicibus aut ramosis, apice clavatis. Sporidia in apicibus capitula formant* ». En 1872, l'espèce *Aspergillus fumigatus* est décrite par Frésénus. L'histoire des espèces de ce genre est ensuite définie au travers les découvertes des affections dont elles sont responsables, que ce soit chez l'Homme ou chez l'animal.

4.1.2. Classification

Le nom *Aspergillus* est donné à un genre de champignons filamenteux appartenant au sous-embranchement des Ascomycètes. La classification des champignons filamenteux du genre *Aspergillus* est présentée dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Taxonomie du genre *Aspergillus*

Embranchement	Eumycota
Sous-embranchement	Ascomycotina
Classe	Eurotyomycetes
Ordre	Eurotiales
Famille	Trichocomaceae

Longtemps regroupés dans les Deutéromycètes, car exclusivement connus sous leur forme asexuée, ils sont désormais associés à leur forme téléomorphe *Eurotium*, *Neosartorya* et *Emericella*. Ce genre comprendrait environ 339 espèces décrites (Samson et al., 2014). Une première classification, basée sur les caractères macroscopiques et microscopiques, a été proposée pour répartir 132 espèces en 18 groupes (Raper et Fennell, 1965). Plus récemment, un total de 4 sous-genres, *Aspergillus*, *Circumdati*, *Fumigati* et *Nidulantes* ainsi qu'un total de 20 sections ont été proposés pour tenir compte des résultats de caractérisation moléculaire (Houbraken et al., 2014 ; Hubka et al., 2015).

4.1.3. Description morphologique

Les *Aspergillus* possèdent un mycélium d'aspect duveteux ou poudreux à croissance rapide et généralement de couleurs vives et très variées (Figure 11).



Figure 11 : Morphologie macroscopique d'une culture d'*Aspergillus fumigatus* (milieu DCA, collection MMS, Université de Nantes)

Le thalle hyalin présente un mycélium cloisonné et est caractérisé par la présence d'un grand nombre de conidiophores dressés. La Figure 12 présente l'aspect microscopique d'un conidiophore d'*Aspergillus*.

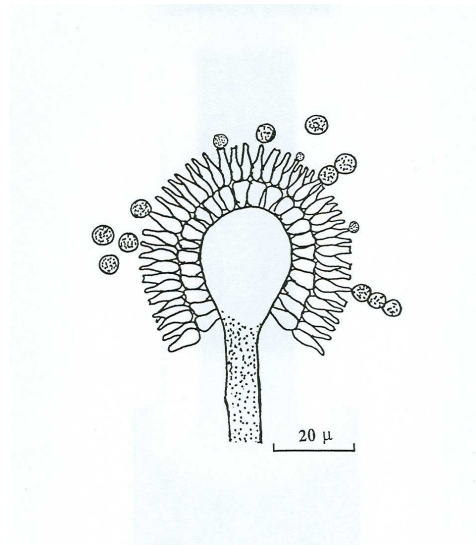


Figure 12 : Schéma de la structure d'un conidiophore d'un *Aspergillus* (<http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?num=4&n=Aspergillus>)

Les conidiophores sont terminés par une vésicule de forme très spécifique appelée « la tête aspergillaire ». Principale caractéristique morphologique de ce genre, elle supporte, soit une seule rangée de phialides (structure unisériée), soit une rangée de phialides et une rangée de cellules sous-jacentes appelées métules (structure bisériée). Les phialides et les métules sont également dénommées stérigmates. Enfin, les conidies sont généralement rondes avec un diamètre de 2 à 3 µm. Produites en grand nombre par les phialides, elles donnent, à la tête conidienne, un aspect radié si les stérigmates couvrent l'ensemble de la vésicule, ou une apparence en colonne si seule la partie supérieure de celle-ci est fertile.

4.2. Le genre *Cladosporium*

4.2.1. Historique

Le genre *Cladosporium* compte parmi ces espèces les plus communes des moisissures d'intérieur ou d'extérieur. Ce genre n'a jamais été décrit avec beaucoup de précision en raison de la variabilité de ses caractères morphologiques. C'est Link qui le décrit pour la première fois en 1816 comme « *Thallus e floccis caespitosis, erectis simplicibus aut subramosis, apicibus in sporidia secedentibus. A Sporothricho et Oidio differt floccis non intricatis, ab Acladio, sporidis apici primum innatis, dein delabentibus* », d'où son nom – *clados* du latin « rameaux » et *spora*, « spores » (Bensch et al., 2012).

4.2.2. Classification

Le genre *Cladosporium* est donné à un genre de champignons appartenant au sous-embranchement des Ascomycètes. La classification des champignons filamenteux du genre *Cladosporium* est présentée dans le Tableau 10.

Tableau 10 : Taxonomie du genre *Cladosporium*

Embranchement	Eumycota
Sous-embranchement	Ascomycotina
Classe	Dothideomycetes
Ordre	Capnodiales
Famille	Cladosporiaceae

Longtemps regroupés dans les Deutéromycètes, car exclusivement connus sous leur forme asexuée, ils sont désormais associés à leur forme téléomorphe comme *Davidiella* par exemple. Ce genre comporte un nombre d'espèces pas clairement défini en raison, probablement, de l'imprécision de la description morphologique. Ce nombre varie donc selon les auteurs. D'après (Ellis, 1971), ce genre comprendrait près de 43 espèces.

4.2.3. Description morphologique

Les *Cladosporium* possèdent un mycélium d'aspect velouté ou floconneux à croissance lente et généralement de couleurs vert olive à brun ou noire terne. La Figure 13 présente l'aspect morphologique macroscopique d'une culture de *Cladosporium*.

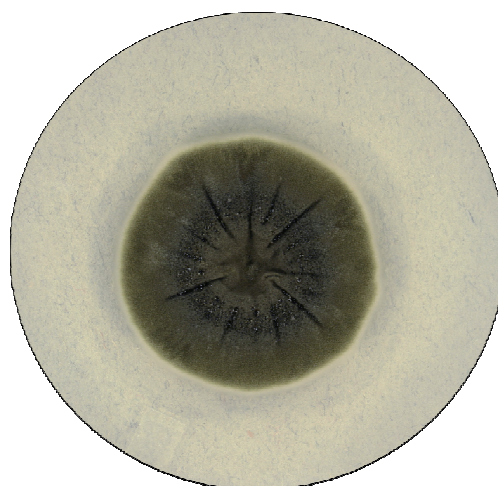


Figure 13 : Morphologie macroscopique d'une culture de *Cladosporium sphaerospermum* (milieu PDA, Medmyco, CC BY-SA 4.0)

Le thalle dématié présente un mycélium cloisonné. La Figure 14 présente l'aspect microscopique de conidiophores du genre *Cladosporium*.

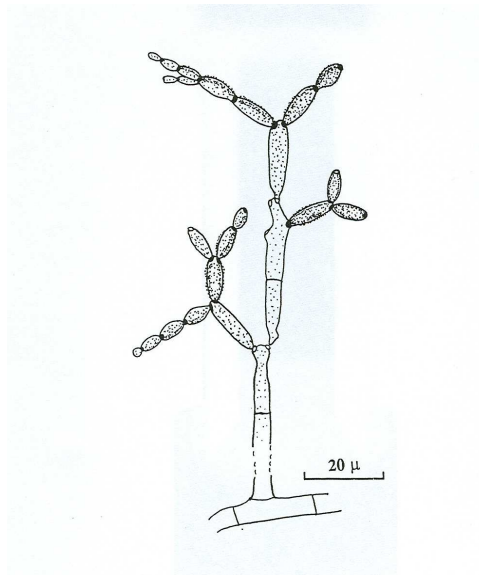


Figure 14 : Schéma de la structure d'un conidiophore d'un *Cladosporium* (<http://mycota-crcc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?lang=eng&num=10&n=Cladosporium>)

Les conidiophores sont plus ou moins distincts du mycélium. Ils sont simples ou ramifiés, parfois à croissance sympodiale, géciculés ou non. Les conidies sont unicellulaires ou multicellulaires en chaînes acropétales ramifiées. Elles sont ovoïdes, elliptiques ou fusiformes et possèdent une paroi lisse ou rugueuse avec des cicatrices d'insertion foncées, souvent bien visibles. On parle de conidies « en bouclier ».

4.3. Le genre *Penicillium*

4.3.1. Historique

Les *Penicillium* représentent avec les *Aspergillus* l'un des plus grands groupes de champignons filamenteux. Les *Penicillium* sont très répandus dans l'environnement ; Il n'existe que très peu d'habitats totalement dépourvus de ce genre.

Décrit par Link en 1809, le genre *Penicillium* regroupe les champignons dont « *Thallus e floccis caespitosis, septatis, simplicibus aut ramosis, fertilibus erectis apice penicillatis. Sporidia in apicibus penicillatis collecta* ». Ce sont des contaminants alimentaires fréquents, mais certaines espèces sont utilisées par l'industrie agroalimentaire comme les espèces *Penicillium roqueforti* et *Penicillium camemberti* pour le fromage par exemple. D'autres ont marqué l'Histoire et notamment celle de la médecine. La découverte de la pénicilline par Fleming en 1928 à partir de l'espèce *Penicillium notatum*, et son utilisation en tant qu'agent antibactérien dans les années 1940, par exemple, a permis de soigner les infections des soldats, première cause de mortalité lors de la seconde guerre mondiale. Cette

découverte qui marquera le début de l'antibiothérapie moderne lui a valu, en 1945, le prix Nobel de médecine partagé avec Monsieur Florey et Monsieur Chain.

Très peu d'espèces de ce genre sont incriminées en pathologie humaine. La gravité de l'incidence de ces champignons sur les aliments ou la santé humaine dépend avant tout de leur aptitude à produire ou non des métaboliques toxiques.

4.3.2. Classification

Le nom *Penicillium* est donné à un genre de champignons filamenteux appartenant au sous-embranchement des Ascomycètes. La classification des champignons filamenteux du genre *Penicillium* est présentée dans le Tableau 11.

Tableau 11 : Taxonomie du genre *Penicillium*

Embranchement	Eumycota
Sous-embranchement	Ascomycotina
Classe	Plectomycetidae
Ordre	Eurotiales
Famille	Trichocomaceae

Longtemps regroupés dans les Deutéromycètes, car exclusivement connus sous leur forme asexuée, ils sont désormais associés à leur forme téléomorphe *Talaromyces* et *Eupenicillium*. Le nombre d'espèces n'est pas clairement défini et varie selon les auteurs. D'après Visagie *et al.* (2014), ce genre comprendrait près de 354 espèces. Une première classification, basée sur les caractères macroscopiques et microscopiques et parfois complétée par des données physiologiques, a été proposée par Pitt pour répartir 137 espèces en quatre sous-genres : *Aspergilloides*, *Penicillium*, *Biverticillium* et *Furcatum* (1979).

Bien que cette classification ait été utilisée au cours de nombreuses années, elle n'est plus, à ce jour, d'actualité. En effet, avec l'arrivée de la biologie moléculaire, le genre *Penicillium* a été divisé en 2 sous-genres, *Aspergilloides* et *Penicillium*, et 25 sections à partir de données phylogénétiques (Houbraken *et al.*, 2014 ; Visagie *et al.*, 2014). De plus, cette classification phylogénétique reste en perpétuelle évolution avec la découverte constante de nouvelles espèces et la création de nouvelles sections (Houbraken *et al.*, 2016).

4.3.3. Description morphologique

Les *Penicillium* possèdent un mycélium végétatif, d'aspect duveteux ou poudreux, à croissance rapide et constitué d'hyphes septés hyalins, peu colorés voire très colorés. Un aspect morphologique macroscopique d'une culture de *Penicillium* est présenté Figure 15.



Figure 15 : Morphologie d'une souche de *Penicillium* sp. (milieu YES, collection MMS, Université de Nantes)

La Figure 16 présente l'aspect microscopique de conidiophores du genre *Penicillium*.

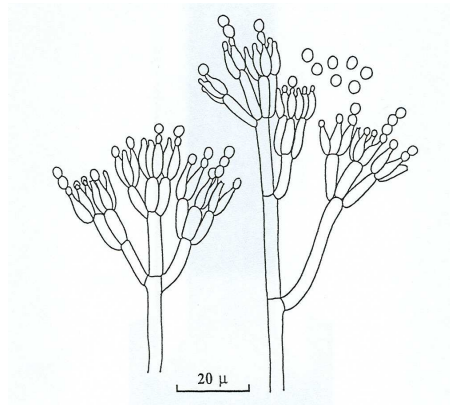


Figure 16 : Schéma de la structure de conidiophores d'un *Penicillium* (<http://mycota-crc.mnhn.fr/site/genreDetail.php?num=33&n=Penicillium>)

Ils sont caractérisés par la présence de conidiophores dressés, plus ou moins ramifiés, et dont l'extrémité, appelée apex, se termine par des phialides. Ces phialides ampouliformes présentent une organisation en forme de « petits pinceaux » ou pénicilles ramifiés, organisation spécifique de ce genre. Selon leur degré de ramification, on parle de *Penicillium* monoverticillés, biverticillés ou triverticillés. Les conidies, produites en grand nombre par les phialides, sont disposées en longues chaînes et contribuent à donner à la tête conidienne un aspect en pinceau. Elles correspondent à des cellules rondes hyalines ou peu colorées.

La classification des *Penicillium* selon Pitt différencie quatre sous-genres : *Aspergilloides*, *Furcatum*, *Biverticillium* et *Penicillium*.

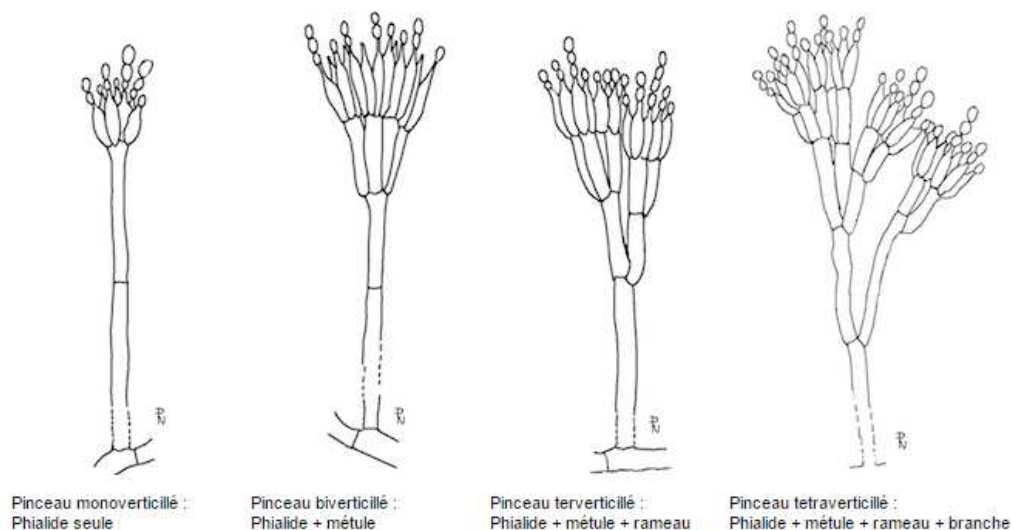


Figure 17 : Organisation des pinceaux de *Penicillium* (d'après <http://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Methodes+d'%C3%A9tudes/Identification+Penicillium>)

Tout d'abord, les *Penicillium* subgenus *Apergilloides* sont monoverticillés, c'est-à-dire que les phialides sont directement implantés sur le conidiophore. On y retrouve les espèces les plus fréquentes telles que *P. glabrum*, *P. spinulosum*, *P. restrictum* par exemple.

Ensuite, les *Penicillium* biverticillés, c'est-à-dire que les phialides sont implantés sur des métules eux-mêmes implantés sur le conidiophore, possèdent deux sous-genres : *Furcatum* et *Biverticillium*. Les *Penicillium* biverticillés subgenus *Furcatum* possèdent 2 à 5 métules, leurs phialides sont ampouliformes et la croissance est supérieure ou égale à 10 mm de diamètre sur le milieu Glucose Nitrate Agar (G25N). On y retrouve les espèces comme *P. citrinum*, *P. corylophilum*, *P. oxalicum* par exemple. Les *Penicillium* biverticillés subgenus *Biverticillium* possèdent plus de 5 métules avec une longueur des métules égale aux phialides et des phialides acérés. Sur milieu Czapek Yeast Extract (CYA), le mycélium est jaune ou rouge avec des exsudats en avers et des pigments au revers. Une croissance lente est caractéristique sur G25N (inférieure ou égale à 10 mm de diamètre). Les espèces les plus fréquentes sont *P. purpurogenum*, *P. pinophilum*, *P. funiculosum* par exemple.

Enfin, les *Penicillium* subgenus *Penicillium* sont terverticillés, c'est-à-dire que les phialides se trouvent sur les métules qui sont, elles-mêmes, portées par des rameaux implantés sur le conidiophore. La croissance est importante sur G25N (18mm) et une croissance est observée à 5°C. Les espèces de ce groupe sont souvent des contaminants des produits agroalimentaires et sont souvent productrices de toxines. On y retrouve *P. brevicompactum*, *P. chrysogenum*, *P. digitatum*, *P. expansum*, *P. griseofulvum*, etc. (Pitt, 1985).

5. Exemple d'un bilan fongique d'un site de production de médicaments stériles injectables

Un site industriel pharmaceutique a accepté de communiquer son bilan microbiologique de l'année 2015 concernant les champignons filamenteux (Figure 15).

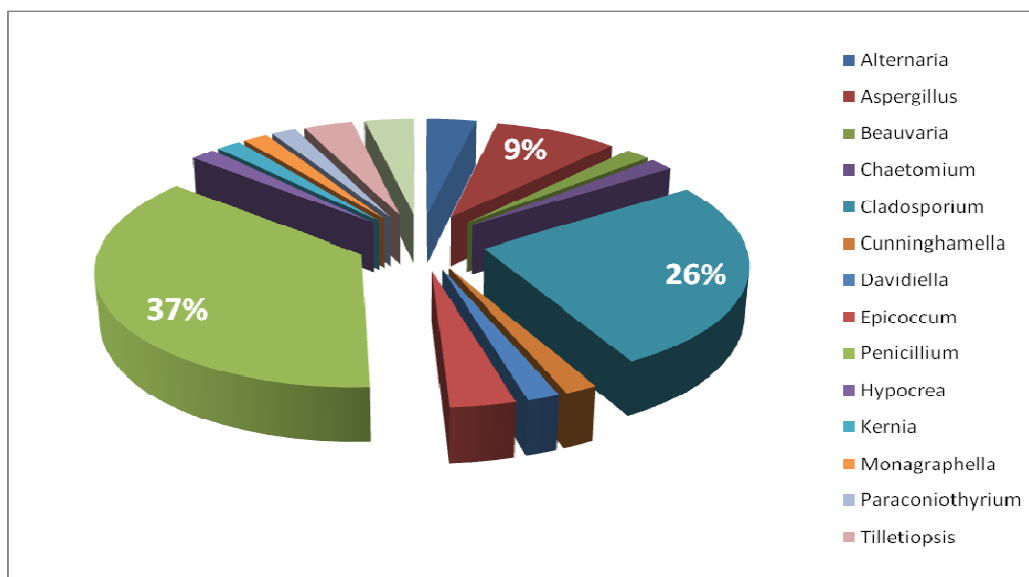


Figure 18 : Bilan microbiologique des identifications fongiques 2015

Un total de 57 souches fongiques a été identifié sur l'année 2015. Sur ces 57 champignons isolés, 23 souches ont été retrouvées dans la ZAC classée A, soit 40% et 34 dans la ZAC classée B, soit 60% (Figure 19).

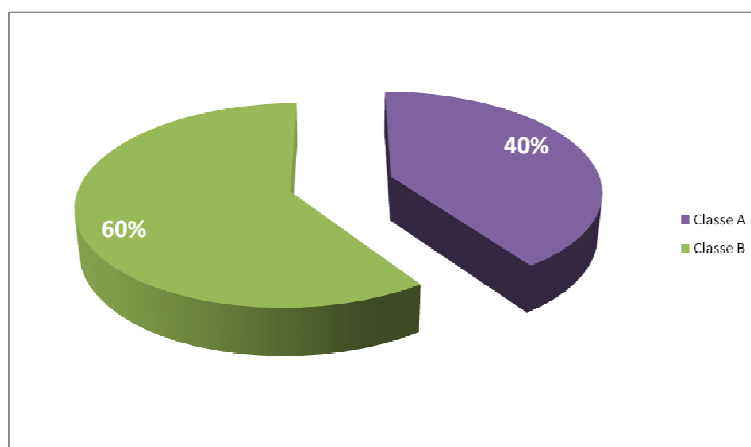


Figure 19 : Répartition du nombre d'identification des souches fongiques en fonction des classes des ZAC

Concernant les 23 souches de la ZAC classée A, 9 souches ont été retrouvées sur les gants opérateurs, soit 39% et 14 souches ont été retrouvées sur les environnements (prélèvements par sédimentation et volumétrie d'air), soit 61% (Figure 20).

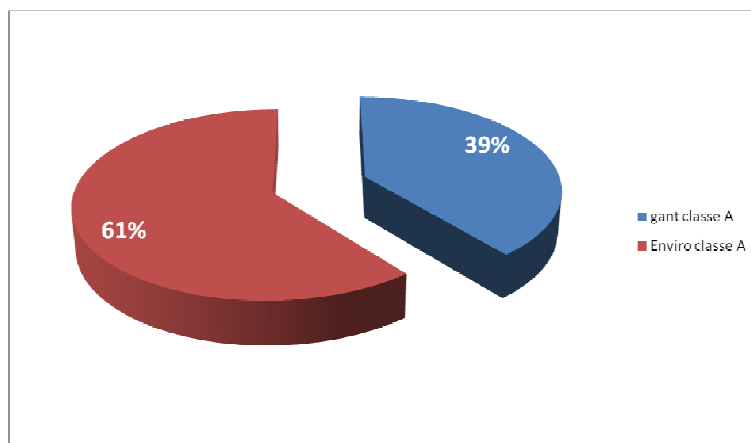


Figure 20 : Répartition du nombre d'identification des souches fongiques de la classe A en fonction du lieu de prélèvement

Concernant les 34 souches de la ZAC classée B, 15 souches ont été retrouvées sur les gants opérateurs, soit 44% et 19 souches sur les environnements (prélèvements par sédimentation et volumétrie d'air), soit 56% (Figure 21).

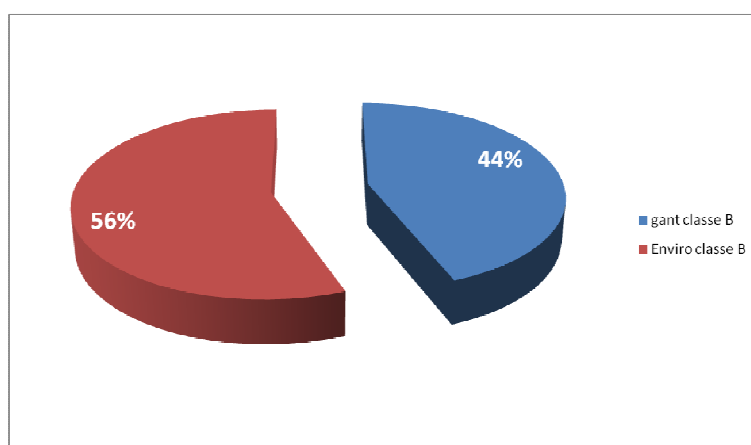


Figure 21 : Répartition du nombre d'identification des souches fongiques de la classe B en fonction du lieu de prélèvement

D'une manière générale, sur ces 57 souches fongiques identifiées en 2015, 21 correspondaient à des *Penicillium* (37%), 15 au genre *Cladosporium* (26%) et 6 souches à des *Aspergillus* (11%). Ces trois genres représentent donc à eux seuls près de 74% des champignons filamenteux identifiés sur ce site. Ce bilan d'identification fongique, spécifique à ce site industriel pharmaceutique, est donc bien en adéquation avec la vision plus large que peut avoir un sous-traitant spécialisé dans ce domaine, comme la société Eurofins IDmyk.

6. Synthèse

Les genres les plus fréquemment rencontrés dans l'environnement industriel pharmaceutique sont au nombre de trois et représentent à eux seuls près de 70% de ces moisissures. Il s'agit du genre *Aspergillus* à hauteur de 26%, du genre *Cladosporium* à hauteur de 22% et du genre *Penicillium* à hauteur de 22% (Carlotti, 2014). De plus, un grand nombre d'entre eux est producteur de mycotoxines et/ou de substances pathogènes pour la santé de l'Homme et de substances délétères pour la qualité du médicament produit. En outre, les champignons filamenteux sont des organismes dont la complexité est connue et reconnue.

Lorsque l'un d'entre eux est découvert sur une zone de production, l'enjeu majeur pour le laboratoire de contrôle qualité est l'identification de cette moisissure avec un degré de précision et un niveau de confiance acceptables. Mais à ce jour, quelles méthodes d'identification des moisissures pourraient être applicables en routine pour le laboratoire de contrôle qualité d'un industriel pharmaceutique ?

Pour répondre à cette problématique d'identification des champignons filamenteux à laquelle est soumise l'industrie pharmaceutique, plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Elles reposent notamment sur l'étude de la morphologie et/ou du génome, protéome ou métabolome de l'individu. Ainsi, dans la partie III, quatre approches d'identification des champignons filamenteux vont être présentées : les approches phénotypiques, génomiques, protéomiques et métabolomiques. Afin d'illustrer cette troisième partie, nous nous intéresserons plus particulièrement au genre *Penicillium*.

Partie III : Méthodes d'identification fongique et application dans un contexte industriel pharmaceutique

1. Approches phénotypiques

1.1. Description morphologique et physiologique

L'approche classique d'identification des champignons filamenteux est basée sur l'observation morphologique de ces derniers. Par le passé, cette description occupait une place centrale dans la taxonomie. Elle correspond notamment à l'architecture physique avec laquelle un organisme fonctionne et s'adapte à son environnement. Quelques aspects physiques d'un mycélium peuvent cependant être imputés de manière spécifique à l'environnement immédiat sur lequel le champignon évolue. Par conséquent, la caractérisation d'une même souche au sein d'un laboratoire peut être différente en fonction des conditions de culture (milieux, température, lumière, humidité,...). Ces effets peuvent être minimisés en utilisant un protocole standardisé pour le milieu de culture, la méthode de repiquage ainsi que les conditions d'incubation. La première étape de cette description morphologique consiste en l'observation macroscopique.

1.1.1. Caractères macroscopiques

Les critères macroscopiques reposent sur l'observation et la description des mycéliums *in vitro* après 3 à 7 jours d'incubation sur des milieux usuels – *Malt Extract Agar* (MEA) ou *Potato Dextrose Agar* (PDA), par exemple – ou spécifiques – Czapek par exemple. Un certain nombre de critères peuvent être décrits comme l'aspect ou la texture du mycélium, sa topographie ou relief ainsi que sa couleur. Tout d'abord, la texture peut être décrite avec quatre adjectifs : un mycélium aérien abondant sera qualifié de texture « laineuse », un mycélium aérien court sera qualifié de « duveteux », un mycélium aérien produisant de nombreuses conidies sera qualifié de « poudreux » et enfin, un mycélium aérien peu abondant avec une surface lisse sera qualifié de « glabre ». La topographie du mycélium peut être qualifiée de « plane », « surélevée », « cérébriforme » ou encore « avec des stries radiales ». L'observation de la couleur du mycélium est effectuée d'une part en avers et d'autre part en revers. La présence de pigments diffusibles doit être notifiée. Un mycélium brun, gris ou noir sera qualifié de « dématié ». Un mycélium de couleur claire voire transparent sera qualifié de « hyalin ».

1.1.2. Caractères physiologiques

Cette description macroscopique peut être complétée par les caractéristiques physiologiques afin de discriminer des espèces macroscopiquement similaires. Lors de cette

étape, la vitesse de croissance peut être évaluée en fonction du diamètre du mycélium à sept jours. Un diamètre du mycélium à 7 jours supérieur ou égal à 3 cm permettra de qualifier la vitesse de croissance « rapide ». Un diamètre du mycélium à 7 jours entre 1 et 3 cm permettra de qualifier la vitesse de croissance « modérée ». Un diamètre du mycélium à 7 jours inférieur ou égal à 1 cm permettra de qualifier la vitesse de croissance « lente ».

Des paramètres importants, pouvant influer sur les différents caractères macroscopiques et physiologiques présentés ci-dessus, sont à prendre en compte lors de cette étape de description macroscopique comme, par exemple, le milieu de culture, la luminosité, l'humidité ainsi que la température d'incubation.

1.1.3. Caractères microscopiques

Les critères microscopiques sont fondés sur l'aspect morphologique des différentes structures du champignon : le thalle, les hyphes, les conidiophores, les conidies et les organes de fructification.

Les caractères morphologiques des hyphes, leur couleur, la présence ou non de cloisons ainsi que leur diamètre approximatif peuvent être décrits. Un hyphe sera considéré comme « large » si son diamètre est supérieur à 4 μm ou « étroit » si son diamètre est inférieur à 4 μm . La couleur, la taille ainsi que la forme des conidiophores peuvent être décrits. Ils peuvent être absents, simples ou ramifiés. La structure et la disposition des conidies sont à décrire également. La couleur, la taille ainsi que la forme sont prises en compte. Elles peuvent être uni- ou pluricellulaires, solitaires, en amas ou en chaînes, de forme ronde, ovale / ampouliforme ou en massue, par exemple. Les études microscopiques sont réalisées à partir d'un échantillon monté entre lame et lamelle dans une goutte d'eau ou de colorant (Rouge Congo, bleu coton, par exemple).

Une illustration d'une approche phénotypique standardisée est la méthode pour l'identification des espèces du genre *Penicillium* mise en place par Pitt en 1988.

1.2. Méthode de PITT

Un certain nombre de méthodes ont vu le jour afin d'identifier les espèces au sein de genre spécifique. C'est le cas, par exemple, de la classification de Pitt pour identifier les *Penicillium* (1988). Elle est basée, d'une part, sur les caractères morphologiques, et, d'autre part, sur les caractères physiologiques. Ainsi, cette méthode s'appuie sur la ramification des conidiophores ainsi que sur la croissance des *Penicillium* sur différents milieux de culture et à

différentes températures d'incubation. La méthode consiste, en effet, à réaliser une incubation de l'espèce à identifier pendant sept jours sur trois milieux de culture différents, à savoir, CYA, MEA et G25N. Ces échantillons sont incubés à différentes températures présentées dans le Tableau 12.

Tableau 12 : Températures d'incubation en fonction des milieux de culture pour l'identification des *Penicillium* par la méthode de PITT

Méthode de PITT			
Milieux	Températures d'incubation (°C)		
CYA	5	25	37
MEA	-	25	-
G25N	-	25	-

Ainsi, la méthode de Pitt nécessite cinq échantillons : un total de trois échantillons est mis en incubation sur un milieu CYA aux températures de 5, 25 et 37°C. Un échantillon est mis en incubation à 25°C sur un milieu MEA. Enfin, un cinquième et dernier échantillon est mis en incubation à 25°C sur un milieu G25N. L'ensemencement de ces milieux est réalisé en trois points à partir d'une suspension de spores dans de l'eau/tween 0,01%. Au terme de ces sept jours d'incubation, trois facteurs sont évalués : il s'agit de la mesure de la croissance radiale, des observations macroscopiques et des observations microscopiques.

Les critères d'observations microscopiques sont les suivants :

- L'organisation des pinceaux et notamment le nombre de ramifications entre les conidies et le conidiophore sur le milieu CYA (cf. Figure 17) ;
- Le nombre de métules par conidiophore ;
- La longueur et la forme des phialides : ampouliforme ou acéré (aiguille de pin)
- Les conidies (forme, ornementation, etc).

Le Tableau 13 résume les différences entre les sous-genres de *Penicillium* selon la méthode de Pitt.

Tableau 13 : Résumé des différences entre les sous genres de *Penicillium* selon la méthode de PITT

Genre	<i>Penicillium</i>			
Sous-Genre	<i>Aspergilloïdes</i>	<i>Furcatum</i>	<i>Biverticillium</i>	<i>Penicillium</i>
Nb de ramifications (conidies/conidiophore)	Monoverticillé	Biverticillé	biverticillé	triverticillé ou tétraverticillé
Nb de métules par conidiophore	-	<5	>5	-
Longueur phialides	-	< aux métules	égale aux métules	-
Forme phialides	-	Ampouliforme	acérée	-
Croissance sur G25N	-	Importante	Lente	importante
Exemples d'espèces	<i>P. glabrum</i> , <i>P. spinulosum</i> , <i>P. restrictum</i>	<i>P. citrinum</i> , <i>P. corylophilum</i> , <i>P. oxalicum</i>	<i>P. purpurogenum</i> , <i>P. pinophilum</i> , <i>P. funiculosum</i>	<i>P. brevicompactum</i> , <i>P. chrysogenum</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P. griseofulvum</i>

Ainsi, la méthode de Pitt permet une identification de la souche isolée au niveau du sous-genre de *Penicillium*. Elle donne donc une orientation mais ne permet pas d'aller plus loin et notamment à l'espèce. Pour cela, la biologie moléculaire reste nécessaire.

1.3. Intérêts et limites

L'étude des caractères morphologiques nécessite peu de matériels et permet une bonne identification au genre. De simples boîtes de milieu de culture, des lames, du ruban adhésif, un microscope ainsi qu'un incubateur sont nécessaires. La documentation est aisée avec les systèmes de microscopes intégrant un appareil photographique. Elle est donc simple, rapide et peu coûteuse en matériels et réactifs.

Si l'identification au genre est assez aisée, elle reste, cependant, subjective et nécessite les compétences d'un mycologue expérimenté et qualifié. Elle reste, également, peu discriminante et il est difficile de différencier des espèces au sein d'un même genre. Le polymorphisme ainsi que la polychromie des champignons selon les conditions environnementales de croissance ne simplifient pas leur identification. Enfin, le nombre toujours croissant d'espèces nouvellement décrites complexifie également cette approche. Les difficultés associées à l'identification des espèces de *Penicillium*, par exemple, ont donné lieu à de nombreuses identifications erronées (Fischer et *al.*, 2003).

Ainsi, cette méthode longue et fastidieuse, souvent imprécise, est incompatible avec les exigences croissantes des textes réglementaires de l'industrie pharmaceutique. Cette approche phénotypique dite « classique » n'est donc plus suffisante.

2. Approches génomiques

2.1. Principe général

Comme les caractéristiques morphologiques de l'approche phénotypique sont parfois insuffisantes pour identifier un champignon, de nouvelles stratégies ont été développées. Elles utilisent des techniques d'identification moléculaire basées sur l'étude des séquences d'un gène, appelé unilocus, d'un fragment d'ADN défini, tel qu'un intron ou un espaceur, ou de plusieurs gènes, appelés multiloci (Verscheure et *al.*, 2002). Ces méthodes sont universelles et permettent d'étudier le polymorphisme afin de discriminer les espèces et les genres des champignons.

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer la succession de nucléotides composant l'ADN. Tout d'abord, l'extraction des acides nucléotidiques à partir d'un mycélium est nécessaire. Ensuite, une amplification du ou des marqueurs moléculaires d'intérêts est réalisée par PCR à l'aide d'amorces universelles complémentaires des séquences d'ADN et situées juste en amont de la zone à séquencer. La particularité du séquençage consiste en l'utilisation de nucléotides légèrement différents, les didésoxyribonucléotides ddNTP présents en faible nombre dans le milieu de réaction alors que les désoxyribonucléotides dNTP sont en grande quantité. Lorsque l'ADN polymérase utilise un ddNTP au lieu d'un dNTP, la synthèse du brin s'arrête. L'incorporation aléatoire de ddNTP permet d'obtenir des fragments d'ADN de taille variable. Les ddNTP sont incorporés, marqués par 4 fluorochromes différents. Les fragments d'ADN obtenus sont de longueurs différentes ; le séquenceur sépare les fragments d'ADN selon leur taille par chromatographie. Les systèmes actuels détectent la fluorescence des 4 nucléotides à partir de la même colonne. Le résultat est présenté sous forme d'électrophorégramme. Enfin, l'alignement des séquences obtenues est effectué, soit graphiquement, soit par texte, c'est-à-dire que les séquences écrites en ligne sont alignées et comparées à des séquences déjà présentes dans des banques de données accessibles sur Internet (NCBI GenBank, par exemple). On peut ainsi obtenir des BLAST, c'est-à-dire des comparaisons avec les séquences les plus proches et l'identification qui correspond, rendus avec un pourcentage d'homologie (Altschul et *al.*, 1990).

2.2. Marqueurs moléculaires d'intérêts

Les régions du génome utilisées pour l'identification par séquençage moléculaire sont appelées marqueurs moléculaires. Elles doivent remplir deux conditions : (1) être ubiquistes, c'est-à-dire présentes chez tous les taxons étudiés et (2) contenir une région variable

spécifique de chaque espèce et encadrée par deux séquences conservées chez la plupart des champignons (Figure 22).

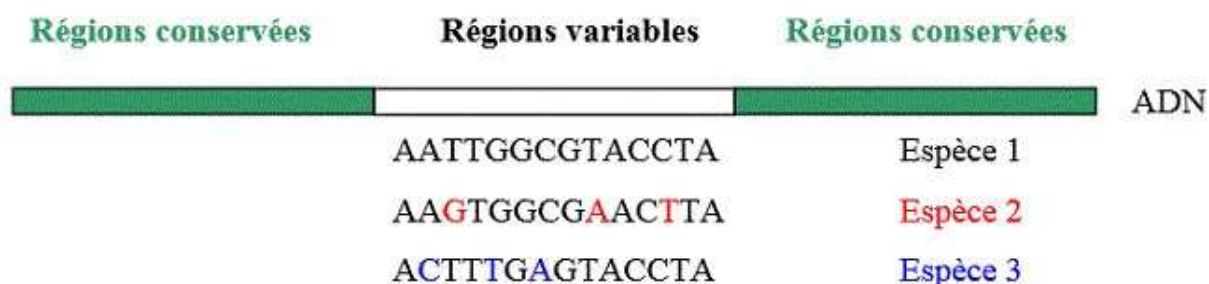


Figure 22 : Comparaison de séquences variables de trois espèces distinctes (d'après takween.com)

La comparaison des séquences des régions variables des différents isolats retrouvés dans l'environnement permet de conclure sur l'identification à l'espèce de ces derniers. Chez les champignons filamenteux, les marqueurs moléculaires utilisés sont les gènes, ou les séquences intergéniques, présents sur le génome nucléaire. Il existe deux types de séquences utilisées pour l'identification moléculaire des champignons : (1) les gènes codant pour les ARN ribosomiques et (2) les gènes codant pour les protéines nucléaires.

2.2.1. Les gènes de l'ARN ribosomique

L'ARN ribosomique est le marqueur d'intérêt le plus connu et le plus fréquemment ciblé pour l'identification des champignons. Il possède effectivement l'avantage d'être présent chez tous les êtres vivants puisqu'il constitue un élément fondamental dans le mécanisme de traduction de l'ARNm en protéine.

Chez les champignons, les gènes codant pour les ARN ribosomiques sont au nombre de quatre ; le gène codant pour l'ARN ribosomique 18 S, qui est constitutif de la petite sous-unité du ribosome également appelée sous unité ribosomique 40S ou *nuclear-Small SubUnit* (nuc-SSU), et les gènes codant pour les ARN ribosomiques 5S, 5,8S et 28S, qui sont constitutif de la grande sous-unité du ribosome également appelée sous unité ribosomique 60S ou *nuclear-Large SubUnit* (nuc-LSU).

Ces gènes sont organisés en groupe d'unités répétées et séparées par les séquences *Inter Genic Spacer* (IGS). A l'intérieur de chaque unité, les gènes 18 S et 5,8 S sont séparés par les séquences *Internal Transcribed Spacer* de type 1 (ITS1) et les gènes 5,8 S et 28 S sont séparés par les séquences ITS2. La Figure 23 présente l'organisation des gènes codant pour l'ARN ribosomique nucléaire.



Figure 23 : Organisation des gènes codant les ARN ribosomiques et des régions intergéniques chez les champignons et présentant un intérêt pour l'identification moléculaire

Généralement, les séquences des gènes codant pour les ARNr 18S, 28S, 5S et 5,8S sont hautement conservées au niveau des phyla, familles et genres. En revanche, les séquences ITS et IGS sont beaucoup plus polymorphes (Berbee et Taylor, 2001). Les séquences ITS présentent notamment des variations interspécifiques importantes alors que les séquences IGS présentent une variabilité intraspécifique élevée. Ainsi, les séquences utilisées pour l'identification moléculaire sont donc les séquences 18S, 28S et ITS.

Les gènes nuc-SSU et nuc-LSU présentent une taille importante comprenant respectivement 1800 et 3200 pb (Neefs et *al.*, 1993). Par conséquent, seule une petite partie de ces séquences, également appelées séquences partielles, est utilisée en identification. Il s'agit des 900 premières bases de la partie 5' du gène nuc-LSU et de 1150 pb pour le gène nuc-SSU.

La séquence ITS, quant à elle, est la région d'ADN la plus largement utilisée pour la phylogénie des champignons. En effet, il est actuellement référencé près de 150 000 séquences d'ITS fongiques dans les bases de données (Damon et *al.*, 2010). Cette séquence comprend les régions ITS1, ITS2 et le gène 5,8S. Sa taille varie de 600 à 700 pb (Mouhamadou et *al.*, 2008). En raison de son haut degré de variation par rapport aux gènes nuc-LSU et nuc-SSU, la région ITS contient les marqueurs permettant la caractérisation et l'identification moléculaire des espèces fongiques (Schoch et *al.*, 2012).

Cependant, il arrive parfois que ces régions ITS, utilisées seules, ne soient pas assez variables pour permettre une distinction des espèces. Par exemple, il n'est pas possible de différencier certaines espèces comme *Aspergillus tamarisii*, *A. nomius* et *A. flavus* (Tam et *al.*, 2014). Dans ces situations, il faut alors avoir recours à d'autres gènes.

2.2.2. Les gènes codant pour les protéines nucléaires

Les protéines nucléaires possèdent des rôles importants au niveau cellulaire. Les séquences codant ces protéines sont donc généralement soumises à de fortes contraintes fonctionnelles. Par conséquent, les mutations sur ces séquences sont rares, ce qui en fait un avantage par rapport aux séquences d'ARNr pour les analyses phylogénétiques. Les gènes les plus utilisés sont ceux qui codent pour la β -tubuline, les ARN polymérases de type II (RPB2), le facteur d'élongation TEF 1, l'actine ainsi que la calmoduline (Hibbett et *al.*, 2007). Ce sont des séquences composées d'une quantité plus importante d'introns ce qui explique qu'elles soient plus variables que l'ADN ribosomal. Ces séquences offrent donc des informations additionnelles pour permettre la distinction d'espèces très proches.

Le gène codant pour la β -tubuline, protéine d'environ 55 kDa, reste très conservé au cours de l'évolution. Cette protéine est, en effet, essentielle au bon fonctionnement de la machinerie cellulaire des eucaryotes lors de la mitose (Einax et Voigt, 2003). Ce gène peut être présent en plusieurs copies dans le génome (Keeling et *al.*, 2000) et possède une taille variant d'environ 700 à 2000 pb due à la présence de nombreux introns (Corradi et *al.*, 2004).

Les gènes RPB1 et RPB2 codent pour les deux grandes sous-unités de l'ARN polymérase de type II. Ils codent plus particulièrement les domaines catalytiques de cette enzyme ce qui lui confère la propriété de posséder des domaines conservés utilisés en phylogénie chez les eucaryotes (Stiller et Hall, 1999 ; Liu et Hall, 2004). Chez les champignons, la séquence partielle du gène RPB2, d'environ 1100 pb, est utilisée pour leur identification et la phylogénie moléculaire (Binder et *al.*, 2010).

Le gène du facteur d'élongation TEF-1 α code pour une protéine qui contrôle le taux et la fidélité de la synthèse protéique. Il est généralement présent en une copie unique dans le génome des champignons (Baldauf, 1999).

Le gène codant pour l'actine, protéine d'environ 42 kDa, reste très conservé au cours de l'évolution. Cette protéine entre, en effet, dans la structure du cytosquelette des cellules. Ce gène est présent en une copie unique dans le génome (Tarkka et *al.*, 2000).

2.2.3. Exemples d'identifications de champignons filamenteux en environnement industriel pharmaceutique

Afin d'illustrer cette approche, trois échantillons de champignons filamenteux issus de l'environnement industriel pharmaceutique ont été identifiés par séquençage moléculaire unilocus du gène codant pour l'ARNr 28S (Figure 24).

LOCUS		281 bp						
ORIGIN								
A	1	GAGTGATCGA	AAGATGAAAA	GCACTTTGAA	AAGAGAGTTA	AAAAGCACGT	GAAATTGTTG	
	61	AAAGGGAAGC	GCTTGCGACC	AGACTCGCTC	GCGGGGTTCA	GCCGGCATTG	GTGCCGGTGT	
	121	ACTTCCCCGC	GAGCGGGCCA	GCGTCGGTTT	GGGCGGTCGG	TCAAAGGCCT	CTGGAAGGTA	
	181	ACGCCCCCTC	GGGGGCGTCT	TATAGCCAGG	GGTGCAATGC	GGCCTGCCCC	GACCGAGGAA	
	241	CGCGCTTCGG	CTCGGACGCT	GGCATAATGG	TCGTAAGCGA	C		
//								
LOCUS		279 bp						
ORIGIN								
B	1	GAGTGATCGA	AAGATGAAAA	GCACTTTGAA	AAGAGAGTTA	AAAAGCACGT	GAAATTGTTG	
	61	AAAGGGAAGC	GCTTGCGACC	AGACTCGCTC	GCGGGGTTCA	GCCGGCATTG	GTGCCGGTGT	
	121	ACTTCCCCGC	GGGCGGGCCA	GCGTCGGTTT	GGGCGGTCGG	TCAAAGGCC	TCGGAAGGTA	
	181	ACGCCCCCTAG	GGGCGTCTTA	TAGCCGAGGG	TGCAATGCGA	CCTGCCTAGA	CCGAGGAACG	
	241	CGCTTCGGCT	CGGACGCTGG	CATAATGGTC	GTAACGAC			
//								
LOCUS		279 bp						
ORIGIN								
C	1	GAGTGATCGA	AAGATGAAAA	GCACTTTGAA	AAGAGAGTTA	AAAAGCACGT	GAAATTGTTG	
	61	AAAGGGAAGC	GCTTGCGACC	AGACTCGCTC	GCGGGGTTCA	GCCGGCATTG	GTGCCGGTGT	
	121	ACTTCCCCGC	GGGCGGGCCA	GCGTCGGTTT	GGGCGGTCGG	TCAAAGGCC	TCGGAAGGTA	
	181	ACGCCCCCTAG	GGGCGTCTTA	TAGCCGAGGG	TGCAATGCGA	CCTGCCTAGA	CCGAGGAACG	
	241	CGCTTCGGCT	CGGACGCTGG	CATAATGGTC	GTAACGAC			
//								

Figure 24 : Séquences du gène codant l'ARNr 28S obtenues à partir de trois échantillons d'environnements industriels pharmaceutiques. A, échantillon n°1 ; B, échantillon n°2 ; C, échantillon n° 3.

Ces séquences ont ensuite été comparées à des séquences de référence à l'aide d'une analyse BLAST sur NCBI. Les résultats sont présentés Figure 25. Les souches de référence, qui possèdent les plus fortes homologues avec la séquence de l'échantillon, sont présentés par ordre décroissant du pourcentage d'homologie (%_Match).

A	Reference Sequence Name	%_Match	Total_Mismatches
	<i>Penicillium brevicompactum</i> CBS257.29 (C)	100.0	0
	<i>Penicillium olsonii</i> CBS232.6 (C)	98.8	4
	<i>Penicillium biourgeianum</i> NRRL865 (C)	97.94	6
	<i>Penicillium kojigenum</i> NRRL3442 (C)	96.89	9
	<i>Penicillium raistrickii</i> NRRL2039 (C)	96.89	9
	<i>Eupenicillium ochrosalmoneum</i> CBS231.6 (C)	96.8	9
	<i>Penicillium citrinum</i> CBS139.45 (C)	96.46	10
	<i>Penicillium roqueforti</i> CBS167.91 (C)	96.44	11
	<i>Eupenicillium baarnense</i> CBS134.41 (C)	96.19	11
	<i>Penicillium digitatum</i> CBS658.68 (C)	96.07	12
B	Reference Sequence Name	%_Match	Total_Mismatches
	<i>Penicillium chrysogenum</i> CBS306.48 (C)	100.0	0
	<i>Penicillium rubens</i> D116-41 (C)	100.0	0
	<i>Penicillium nalgiovense</i> CBS352.48 (C)	99.72	1
	<i>Penicillium commune</i> CBS474.92 (C)	99.65	1
	<i>Penicillium polonicum</i> CBS112560 (C)	99.65	1
	<i>Eupenicillium crusaceum</i> FRR3556 (C)	99.64	1
	<i>Penicillium hirsutum</i> DAOM221131 (C)	99.63	1
	<i>Penicillium hordei</i> CBS701.68 (C)	99.63	1
	<i>Penicillium verrucosum</i> CBS603.74 (C)	99.63	1
	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> CBS324.89 (C)	99.51	2
C	Reference Sequence Name	%_Match	Total_Mismatches
	<i>Penicillium commune</i> CBS474.92 (C)	100.0	0
	<i>Penicillium polonicum</i> CBS112560 (C)	100.0	0
	<i>Penicillium tricolor</i> CBS 101488 (C)	100.0	0
	<i>Penicillium griseofulvum</i> ATCC 9260 (C)	100.0	0
	<i>Penicillium aurantiogriseum</i> CBS324.89 (C)	99.83	1
	<i>Penicillium camemberti</i> CBS190.67 (C)	99.67	1
	<i>Penicillium clavigerum</i> CBS310.48 (C)	99.67	1
	<i>Penicillium commune</i> CBS311.48 (C)	99.67	1
	<i>Penicillium corylophilum</i> CBS312.48 (C)	99.67	1
	<i>Penicillium palitans</i> BM-02-11-152 (C)	99.67	1

Figure 25 : Résultats des comparaisons de séquences d'ARNr28S obtenus pour les trois échantillons d'environnements industriels pharmaceutiques. A, échantillon n°1 ; B, échantillon n°2 ; C, échantillon n°3.

Avec une homologie égale à 100% avec une seule séquence de référence et avec des homologies inférieures ou égales à 98,8 % pour les autres séquences de référence, l'échantillon n°1 a été identifié comme correspondant à l'espèce *Penicillium brevicompactum*. Le séquençage moléculaire unilocus du gène codant l'ARN 28S pour cet échantillon semble ici suffisant mais ce n'est pas toujours le cas.

En effet, si l'on s'intéresse à l'échantillon n°2, avec des homologies égales à 100% pour deux séquences de référence différentes, la souche n°2 peut être identifiée comme étant *Penicillium chrysogenum* ou *Penicilium rubens*. L'identification sur la base du séquençage du gène 28S ne semble donc pas suffisante et un doute subsiste quant à l'identification précise du champignon.

Avec des homologies égales à 100% avec quatre séquences de référence différente, l'échantillon n°3 peut correspondre à *Penicillium commune*, *P. polonicum*, *P. tricolor* ou *P. griseofulvum*. Comme pour l'échantillon n°2, il est difficile, sur la base de ce séquençage, de proposer une identification fiable pour l'échantillon n°3.

Les résultats des comparaisons des séquences obtenues pour les échantillons n°2 et n°3 démontrent donc les limites du séquençage moléculaire unilocus. Afin de compléter ces résultats, les trois échantillons de champignons filamenteux issus de l'environnement industriel pharmaceutique ont été identifiés par séquençage moléculaire unilocus du gène codant pour la β -tubuline. Les résultats sont présentés Figure 26.

A		%_Match	Total_Mismatches
Reference Sequence Name			
Penicillium brevicompactum DI16-89 (C)		99.58	2
Penicillium brevicompactum CBS110067 (C)		97.67	11
Penicillium brevicompactum ATHUM 5048 (C)		97.59	11
Penicillium bialowiezense AS3.15314 (C)		88.57	53
Penicillium bialowiezense AS3.15319 (C)		88.57	53
Penicillium biourgeianum NRRL32207 (C)		88.55	50
Penicillium scabrosum DAOM214786 (C)		84.52	75
Penicillium swiecickii DAOM214775 (C)		83.74	79
Penicillium olsonii ATHUM5184 (C)		83.46	76
Penicillium ochrocloron ATHUM5088 (C)		83.17	78
B		%_Match	Total_Mismatches
Reference Sequence Name			
Penicillium chrysogenum ATHUM5058 (C)		100.0	0
Penicillium chrysogenum DTO100F7 (C)		100.0	0
Penicillium allii-sativi DTO148I4 (C)		98.54	6
Penicillium vanluykii DTO148I2 (C)		98.28	7
Penicillium chrysogenum CBS306.48 (C)		98.13	8
Penicillium tardochrysogenum DTO149B9 (C)		98.02	8
Penicillium chrysogenum DAOM212031 (C)		97.83	9
Penicillium rubens CBS307.48 (C)		97.82	9
Penicillium desertorum DTO148I5 (C)		97.77	10
C		%_Match	Total_Mismatches
Reference Sequence Name			
Penicillium griseofulvum NRRL2300 (C)		100.0	0
Penicillium dipodomyicola NRRL13487 (C)		96.42	15
Penicillium expansum ATHUM2534 (C)		93.63	28
Penicillium sinaicum CBS279.82 (C)		92.79	29
Penicillium glandicola ATHUM3001 (C)		92.19	35
Penicillium vulpinum ATHUM5187 (C)		91.95	34
Penicillium desertorum DTO148I5 (C)		91.73	34
Penicillium dipodomyis NRRL13485 (C)		91.44	35
Penicillium desertorum DTO16B5 (C)		91.37	35
Penicillium nordicum CBS109541 (C)		91.31	38
Penicillium polonicum CBS 101479 (C)		91.04	37
Penicillium commune NRRL 35686 (C)		88.88	41

Figure 26 : Résultats des comparaisons de séquences de β -tubuline obtenus pour les trois échantillons d'environnements industriels pharmaceutiques. A, échantillon n°1 ; B, échantillon n°2 ; C, échantillon n°3.

Avec des homologies supérieures ou égales à 97,59% pour trois séquences de référence d'espèce identique et avec des homologies inférieures ou égales à 88,8 % pour les autres séquences de référence d'espèces différentes, l'identification de l'échantillon n°1 semble correspondre à *Penicillium brevicompactum*. Le séquençage moléculaire unilocus du gène codant la β -tubuline vient donc confirmer la première identification (séquençage 28S) écartant le risque d'identification erronée.

Avec des homologies égales à 100% avec deux séquences de référence d'espèce identique et avec des homologies inférieures ou égales à 98,54 % pour les autres séquences de

référence d'espèces différentes, l'échantillon n°2 semble correspondre à *Penicillium chrysogenum*. L'analyse complémentaire de ces deux séquençages - ARNr 28S / β -tubuline - permet donc de conclure sur *Penicillium chrysogenum*.

Enfin, avec des homologies égales à 100% avec une séquence de référence et avec des homologies inférieures ou égales à 96,42 % pour les autres séquences de référence d'espèces différentes, l'échantillon n°3 peut être identifié comme *Penicillium griseofulvum*. L'analyse complémentaire de ces deux séquençages - ARNr 28S / β -tubuline - permet de conclure que cette souche semble appartenir à l'espèce *Penicillium griseofulvum*. Ces analyses montrent bien qu'une identification multiloci permet donc de fiabiliser les résultats d'identification par biologie moléculaire.

2.2.4. Synthèse

Depuis maintenant près de 20 ans, les méthodes moléculaires ont connu un essor considérable dans la taxonomie des champignons filamenteux. Les séquences des gènes codant les ARN ribosomiques (18S, 28S) ainsi que les régions intergéniques non transcrites de ces gènes (ITS1 et ITS2) ont été très utilisées en phylogénétique pour distinguer les espèces fongiques. C'est pourquoi, une analyse unilocus, à l'aide de l'un de ces deux types de marqueurs, permet une bonne identification au genre (Carlotti, 2014). Par ailleurs, la combinaison des deux régions ITS (ITS1/ITS2) permet d'obtenir de meilleurs résultats d'identification que l'utilisation de l'une ou de l'autre séparées (ITS1 ou ITS2). C'est pourquoi, les régions intergéniques ITS1-ITS2 combinées, ont été proposées comme « code barre de la vie » pour les espèces animales, les plantes et les champignons (Schoch et *al.*, 2012). En revanche, il n'y a pas, à l'heure actuelle, de consensus sur un marqueur universel (unilocus). De plus, certaines espèces de genres importants pour l'industrie pharmaceutique, comme *Aspergillus*, *Penicillium* ou encore *Cladosporium* par exemple, ne peuvent pas être différenciés uniquement avec ces marqueurs seuls (Schubert et *al.*, 2007 ; R. Samson et *al.*, 2004 ; Geiser et *al.*, 2007). L'identification plus précise à l'espèce nécessite l'utilisation d'autres marqueurs d'intérêts (Schoch et *al.*, 2012). Parmi eux, les gènes constitutifs ou « House Keeping Genes », codant principalement pour des protéines essentielles aux fonctions cellulaires de base, varient selon les groupes fongiques, les genres voire les espèces. Les gènes codant pour le facteur d'élongation TEF1 α , l'actine, la β -tubuline, les différentes sous-unités des ARN polymérases en sont des exemples (Tableau 14).

Tableau 14 : Principaux marqueurs fongiques disponibles dans les bases de données en 2009 (d'après Begerow et al. 2010 modifié)

Marqueurs fongiques	Nombre de séquences disponibles
ITS incluant 5,8S	147 042
SSU	136 588
LSU	115 228
β -tubuline	14 921
Actin	4 124
RPB2	8 316
EF1 α	7 235

Cette approche « multiloci », basée sur la comparaison simultanée de plusieurs marqueurs d'intérêts, permet de pallier aux limitations des approches unilocus. Ainsi, la distinction fiable et précise des espèces est améliorée dans de nombreux cas (Carlotti, 2014).

2.3. Intérêts et limites

Cette technique apparait comme intéressante, particulièrement lorsqu'elle s'affranchit de l'étape de repiquage qui est chronophage dans les méthodes classiques. Le travail à partir d'une culture jeune et pure permet un important gain de temps dans l'identification du champignon. Elle s'applique à tous les champignons, y compris ceux ne sporulant pas, grâce à des banques de données bien développées. Une analyse unilocus à l'aide de marqueur comme l'ARNr 28S ou l'ITS1 et 2 permettra une bonne identification au genre (Carlotti, 2014).

Parmi les inconvénients, cette méthode d'identification nécessite la comparaison à des séquences de référence. Il existe deux types de banques de données moléculaires : privées et publiques. La consultation d'une banque de données privée engendre un coût supplémentaire alors que la banque de données publique, libre d'accès par définition, est incrémentée par toute la communauté scientifique. Il existe donc un risque que des séquences de marqueurs d'intérêts erronées ou incorrectement identifiées soient déposées pouvant ainsi entraîner des mauvaises identifications des souches isolées. Ces collections publiques, comme GenBank (NCBI) par exemple, sont donc des outils essentiels pour l'identification mais celles-ci peuvent s'avérer très compliquées pour un personnel technique non qualifié ou inexpérimenté pour ces techniques (Kõljalg et al., 2013 ; Schoch et al., 2014). Il devra donc garder un regard critique par rapport à l'ensemble des informations collectées.

L'amplification par PCR peut également présenter quelques difficultés. Le risque de contamination entre les échantillons, l'extraction préalable délicate et lente mais nécessaire ainsi que la nécessité d'un personnel qualifié font partie des limites de cette approche.

Elle représente, pour le laboratoire de l'industriel pharmaceutique, un coût plus important en raison des investissements lourds comme les équipements ou les réactifs onéreux par rapport à une simple identification morphologique.

Par ailleurs, il arrive parfois que l'alignement des séquences obtenues avec celles présentes dans les bases de données ne permettent pas de donner de résultats francs sur un nom d'espèce. En effet, les séquences amplifiées ne sont pas assez spécifiques et donc non discriminantes.

Enfin, une bonne connaissance de la mycologie reste cependant requise et nécessaire, notamment sur la taxonomie fongique ne serait-ce que pour gérer les noms des formes téléomorphes et anamorphes d'une même espèce.

Ainsi, l'identification des souches fongiques par l'approche génomique n'est viable que si elle fait l'objet d'une sous-traitance auprès de laboratoires spécialisés quand le laboratoire de contrôle qualité de l'industriel pharmaceutique ne possède pas ces compétences et/ou ces techniques. Il existe de nombreux laboratoires spécialisés dans l'identification des microorganismes comme les sociétés Eurofins IDmyk, ACM Pharma et CARSO Pharmaceutique, par exemple.

3. Approches protéomiques

3.1. Définitions

La protéomique consiste en « l'étude de l'ensemble des protéines exprimées dans un organite, une cellule, un tissu, un organe ou un organisme à un temps donné et dans des conditions données » (Kenyon et *al.*, 2002). L'approche protéomique permet d'identifier, de quantifier ainsi que de caractériser les protéines (Patterson et Aebersold, 2003). L'ensemble de ces protéines est nommé protéome.

L'analyse protéomique est une étude dynamique : un génome peut conduire à plusieurs protéomes différents. Un certain nombre de facteurs peuvent être à l'origine de ce phénomène comme, par exemple, les modifications post-traductionnelles liées au stress environnemental pour les souches fongiques (Patterson et Aebersold, 2003).

On peut distinguer deux grands types d'analyse protéomique : la protéomique descriptive s'intéressant aux protéines, à leur niveau d'expression, à leur localisation ainsi qu'à leurs modifications post-traductionnelles et la protéomique fonctionnelle, quant à elle, qui s'intéresse aux interactions et aux activités des protéines. L'identification des protéines fait donc appel à la protéomique descriptive et plus particulièrement à la protéomique qualitative en se concentrant sur les protéines constamment exprimées et très abondantes telles que les protéines ribosomiques. Un certain nombre de méthodes ont été décrites (Porquet, 2004).

L'une de ces méthodes, qui a connu un essor considérable dans le domaine de la biologie et qui a émergé pour l'identification des microorganismes, est basée sur l'analyse du protéome par spectrométrie de masse MALDI-TOF (Mermet, 2013).

3.2. Spectrométrie de masse MALDI-TOF

3.2.1. Principe

La spectrométrie de masse est une technologie datant du début du XX^e siècle. Elle consiste à séparer et identifier des molécules selon leur masse et leur charge.

Le spectromètre de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionisation) est un spectromètre utilisant une source d'ionisation laser assistée par une matrice et un analyseur à temps de vol (Time Of Flight, TOF). Cette technique permet d'ioniser des molécules de grande taille, peu volatiles et sensibles à la chaleur sans les dégrader. Elle s'applique aux biomolécules plus fragiles comme les protéines microbiennes.

Le dépôt est soumis à de nombreux tirs laser à l'intérieur de l'appareil qui conduit à l'ionisation des protéines. Les ions sont ensuite séparés par des champs électriques d'après leur masse et leur temps de vol dans le tube à vide de l'instrument. Le résultat est l'obtention d'un spectre (série de pics) prenant en compte l'intensité des pics (quantité de protéines présentes) et la masse (exprimée en rapport masse sur charge ou m/z).

3.2.2. Désorption Ionisation

Le principe d'ionisation par la technique MALDI est présenté en Figure 27.

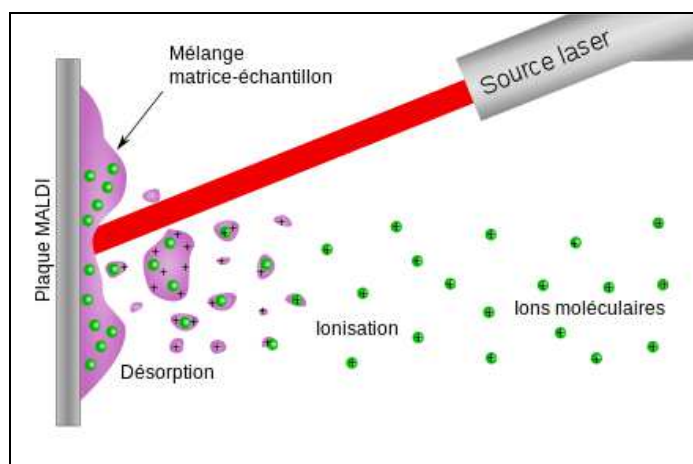
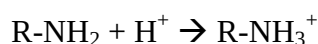


Figure 27 : Principe d'ionisation par la technique MALDI (https://fr.wikipedia.org/wiki/D%C3%A9sorption-ionisation_laser_assist%C3%A9e_par_matrice)

Un laser U.V., de 337 nm de longueur d'onde, est pulsé en direction de la cible. La matrice, ayant une grande réactivité pour l'absorption de la lumière U.V., absorbe l'énergie du laser protégeant ainsi les molécules protéiniques de la dégradation. L'énergie du laser produit deux phénomènes : (1) la désorption c'est-à-dire la vaporisation de la matrice libérant les protéines, (2) le transfert des protons de la matrice à l'analyte qui s'ionise. L'analyte (en vert) est cristallisé dans la matrice (en violet).

Les protéines ont des groupements accepteurs de protons et sont ionisées positivement. Cette réaction est présentée ci-dessous :



3.2.3. Spectrométrie à temps de vol

La spectrométrie à temps de vol est une technique séparant les substances ionisées en fonction de leur charge et de leur poids moléculaire. La séparation se fait entre une anode et une cathode dirigeant ainsi les molécules ionisées vers l'électrode portant la charge inverse des ions à analyser. Les ions passent ensuite à travers un champ électrique de force connue accélérant leur progression. Le spectromètre mesure le temps que mettent les différents ions à atteindre le détecteur. Les grosses molécules mettent plus de temps que les petites molécules. Elles sont donc séparées en fonction de leur m/z . Le principe de cette technique est présenté Figure 28.

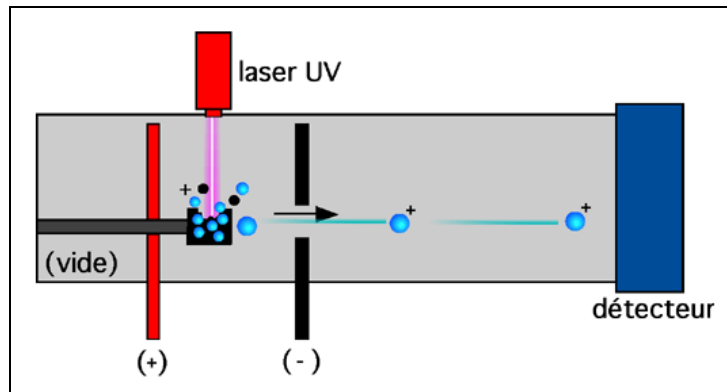


Figure 28 : Principe TOF (<http://images.google.fr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fbiochimiedesproteines>)

Le détecteur traduit l'impact des ions en signal. Ces informations enregistrées sont ensuite envoyées à l'analyseur qui va traiter les données et les présenter sous forme de spectre.

3.2.4. Spectre de masse

Les données enregistrées sont, tout d'abord, calculées afin de transposer les résultats dans un spectre où chaque pic correspond à un type de molécule. L'axe des ordonnées représente l'intensité relative du signal et l'axe des abscisses indique le rapport m/z . Un exemple classique de spectre obtenu en spectrométrie de masse MALDI-TOF est présenté Figure 29.

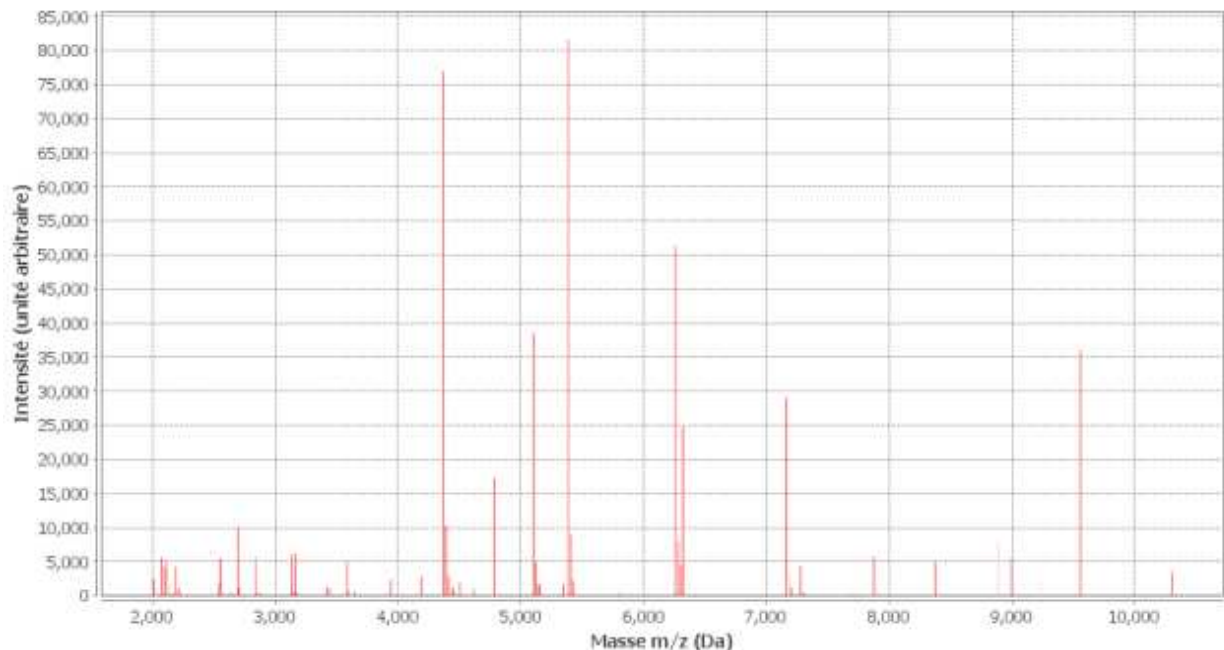


Figure 29 : Spectre généré lors d'une analyse MALDI-TOF (d'après BioMérieux)

3.3. Application à l'identification des champignons

L'intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-TOF dans la discrimination d'espèces fongiques, dont celles du genre *Penicillium*, n'a été exploré que dans les années 2000 (Amiri-Eliasi et Fenselau, 2001 ; Welham et al., 2000 ; Valentine et al., 2002). Dans une étude réalisée en 2005, Chen et Chen ont rapporté la capacité à discriminer six espèces de *Penicillium* sur la base de leur empreinte protéique (Chen et Chen, 2005). De la même manière, Hettick et al. en 2008, ont rapporté la capacité à discriminer douze espèces de *Penicillium*, soit deux fois plus (Hettick et al., 2008). Un exemple de cette étude est illustré Figure 30. Elle représente les empreintes spectrales brutes obtenues par spectrométrie de masse MALDI-TOF à partir de quatre espèces fongiques appartenant au genre *Penicillium*.

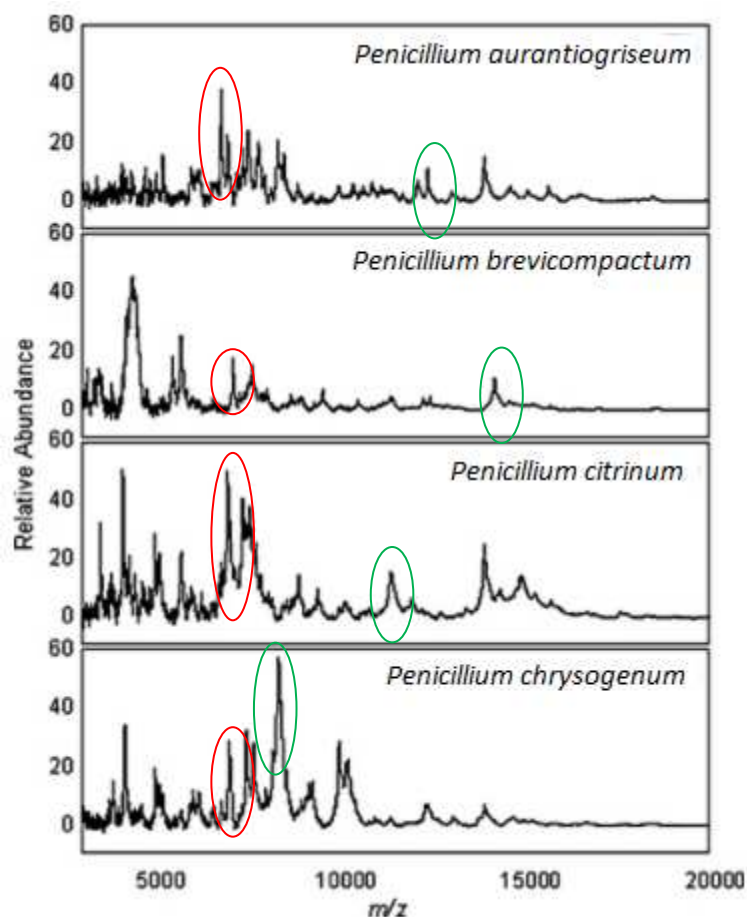


Figure 30 : Empreintes spectrales obtenues à partir de quatre espèces fongiques différentes (adapté d'après Hettick et al., 2008)

On observe des pics communs à l'ensemble de ces quatre spectres, entourés en rouge, illustrant le partage d'une, et parfois plusieurs, protéine(s) commune(s). Ces protéines, présentes quelle que soit l'espèce, sont donc spécifiques du genre du champignon filamenteux et peuvent être considérées comme des marqueurs du genre. On observe également des pics

spécifiques à chaque spectre, entourés en vert, permettant de différencier les espèces. Ces protéines pourraient donc être spécifiques à ces dernières et permettent de discriminer les quatre espèces de *Penicillium*. Ainsi, chaque spectre, ou empreinte protéique, sera différent(e) d'un genre à l'autre et d'une espèce à l'autre : il est spécifique à l'espèce recherchée.

Dès lors, on comprend bien que cette approche, permettant de discriminer les espèces sur la base de leur empreinte spectrale protéique MALDI, a intéressé les industriels dans le développement et la mise au point d'outils d'identification adossés à leurs instruments d'analyse. En effet, les données spectrales obtenues peuvent être utilisées comme empreinte de chaque champignon isolé et comparées à des spectres de masse pour lesquels les identités des champignons sont connues. Ces alignements de spectres, par analogie en quelque sorte avec les alignements de séquences ADN; pourraient permettre d'obtenir des scores d'homologie et ainsi traduire une certaine proportion d'identité commune entre le champignon à identifier et les champignons de référence dont les données spectrales sont déposées dans des bases de données (payantes ou privées et développées en interne).

Cette approche a d'ailleurs été développée et optimisée par BioMérieux sous la forme d'un logiciel de retraitement des données équipant le spectromètre de masse Vitek® MS dans un but d'identification des microorganismes sur la base de leur empreinte spectrale. Ainsi, chaque isolat analysé obtient un niveau de confiance attribué à chaque identification en raison de la variabilité intra espèce (Figure 31).

Niveau de confiance	Choix	% probabilité	Commentaires
Bonne	1	60 à 99,9	
Faible discrimination	2 à 4	Somme = 100	Autres tests nécessaires pour les séparer
ID absente	N/A	N/A	Pas de choix significatif
	> 4	Somme < 100	Identification non concluante

Figure 31 : Exemple de niveau de confiance fournit par le Vitek® MS Biomérieux

Après analyse, si le logiciel propose une seule identification avec un pourcentage de probabilité compris entre 60 et 99,9%, le niveau de confiance est bon. L'espèce identifiée correspond bien à l'espèce recherchée. Si le logiciel propose plusieurs choix d'identification avec un pourcentage de probabilité réparti de façon équitable entre les différents choix, le niveau de confiance est faible. Ainsi, d'autres tests s'avèreront nécessaires pour identifier correctement l'isolat. Si le logiciel propose plus de 4 choix ou ne propose aucun choix d'identification, le niveau de confiance indique « identité absente ».

Si les empreintes protéomiques, obtenues par spectrométrie de masse MALDI-TOF, sont utilisées en routine pour l'identification des bactéries depuis plusieurs années maintenant, cette méthode s'avère plus compliquée pour les champignons filamenteux d'origine environnementale. En effet, les bases de données en vigueur sont actuellement moins développées pour ces derniers. Par exemple, BioMérieux, propose un équipement fourni avec une base de données « Knowledge v3.0 » contenant 164 espèces fongiques, conçue principalement pour un usage clinique. Elle ne couvre pas encore une large gamme de champignons d'origine environnementale. En comparaison, cette même base de données contient 882 bactéries issues de tous milieux. Toutefois, le développement de ces outils est en cours grâce à des partenariats privés entre les différents constructeurs (BioMérieux, Bruker) et des entreprises spécialisées dans l'identification de microorganismes.

3.4. Intérêts et limites

Les avantages de l'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF sont nombreux. Elle est, tout d'abord, rapide avec un résultat d'identification en quelques minutes après culture pour les laboratoires équipés de spectromètres de masse, de logiciel de retraitement et de base de données d'empreintes spectrales conséquentes. Ce gain de temps, par rapport à d'autres méthodes plus longues, peut être parfois très bénéfique pour le processus de libération de lots ou dans la mise en œuvre d'actions correctives dans le processus de production suite à la détection de contaminations environnementales. Elle est, ensuite, simple d'utilisation et, enfin, économique en termes de réactifs et de consommables. Elle permet donc une bonne maîtrise des coûts pour le laboratoire de contrôle qualité de l'industriel, par rapport à l'utilisation d'autres méthodes telles que le séquençage ou l'envoi à des laboratoires spécialisés, et de temps car l'analyse est réalisée directement au laboratoire. De plus, il n'y a pas besoin d'un technicien spécialisé en mycologie ou expérimenté dans l'identification des champignons filamenteux comme pour la méthode phénotypique par exemple. En revanche, il faut savoir rester critique par rapport à un résultat d'identification à cause notamment des bases de données pas encore assez développées et des risques d'identification erronée.

Le principal inconvénient de cette méthode d'identification à ce jour est la faible représentativité des espèces fongiques dans les bases de données. En effet, la spectrométrie de masse a beaucoup été utilisée dans le diagnostic médical, bactérien principalement et plus rarement fongique (Murray, 2012). Cependant, les microorganismes, et plus particulièrement les espèces fongiques, issus de l'environnement que ce soit hospitalier et/ou industriel

pharmaceutique ne sont pas toujours identiques aux souches responsables de pathologies médicales. Cette méthode n'étant pas utilisée jusqu'alors pour le monitoring environnemental, ces souches ne sont donc pas présentes dans les bases de données spectrales. Les différents protagonistes de l'industrie pharmaceutique ont détecté le potentiel de cette méthode et ils commencent donc, aujourd'hui, à développer les bases de données avec les souches environnementales. La robustesse de cette approche protéomique et la fiabilité des résultats d'identification sont exclusivement basées sur le contenu et la qualité des bases de données. C'est pourquoi, elles doivent inclure plusieurs isolats d'une même espèce afin de couvrir la variabilité intra espèce. Ce travail nécessite que toutes les souches utilisées dans la construction des bases de données soient au préalable caractérisées par des méthodes moléculaires (Chatellier, 2012). La création puis la validation des bases de données est donc un processus long, fastidieux et complexe. Il est actuellement développé par les entreprises privées commercialisant les équipements, et/ou en interne dans les laboratoires spécialisés. Cette approche n'est donc pas autant démocratisée que la génomique qui possède une banque de données libre d'accès. Ainsi, il s'agit de l'inconvénient majeur par rapport à la biologie moléculaire.

Un deuxième inconvénient de cette méthode d'identification est l'extraction des protéines. Le risque lors de cette première étape clé, réalisée par lyse chimique ou lyse mécanique par billes de verre par exemple (Chen et Chen, 2005), est la dégradation des protéines. Cette dégradation peut avoir pour conséquence, soit l'absence des protéines d'intérêts pour l'identification à l'espèce du champignon filamenteux, soit une concentration en protéines d'intérêts trop faible. Elle pourra entraîner soit une identification erronée de l'espèce soit une absence d'identification. Cette étape du processus, qui peut avoir une influence sur l'identification, doit donc être procédurée/normée et être réalisée par un personnel formé et validé.

Un troisième inconvénient est que les cultures et les méthodes d'extraction doivent être standardisées pour palier à la variabilité du protéome au sein d'une même souche.

Enfin, si le coût de fonctionnement en routine est très attractif, l'acquisition de ce type d'équipement reste onéreuse (environ 400 000 euros).

4. Approches métabolomiques

4.1. Définitions

Les métabolites sont de petites molécules chimiques dont la masse moléculaire est généralement inférieure à 1500 Da.

Un métabolite primaire ou constitutif est directement impliqué dans la croissance, le développement ou la reproduction d'une cellule. Ce composé possède donc une fonction physiologique indispensable à l'organisme. Les métabolites primaires comprennent notamment les acides aminés et les peptides, les lipides, les sucres et les nucléotides.

Inversement, un métabolite secondaire ou spécialisé n'est pas impliqué dans ces processus physiologiques fondamentaux. Ces composés sont produits en fonction des conditions environnementales par un nombre limité d'espèces fongiques au sein d'un genre, d'un ordre ou encore d'un phylum ce qui lui confère un pouvoir de discrimination important contrairement aux métabolites primaires. Les mycotoxines en sont un exemple.

L'ensemble des métabolites produits par une espèce fongique est appelé le métabolome. Ce métabolome est variable selon les espèces mais aussi en fonction des conditions externes de développement, à savoir, la température et/ou le milieu/substrat de croissance, par exemple. Un profil métabolique se compose donc de l'ensemble des composés qu'un champignon peut produire comme des toxines et des antibiotiques par exemple. Le métabolome fongique a été estimé à près de 15000 métabolites (Mapari et *al.*, 2005).

Ainsi, la métabolomique est l'étude qualitative et quantitative de tous les métabolites présents dans un système biologique à un temps donné et dans des conditions données. L'analyse métabolomique est une étude dynamique : un protéome peut conduire à plusieurs métabolomes différents. Monsieur Ezan disait du métabolome qu'il « représente l'ultime réponse d'un organisme à une altération génétique, une pathologie, une exposition à un toxique ou toute cause environnementale ». Un certain nombre de facteurs peuvent être à l'origine de ce phénomène comme, par exemple, les modifications post-traductionnelles liées au stress environnemental subi par nos souches fongiques (Patterson et Aebersold, 2003).

On peut distinguer deux grandes approches métabolomiques : la métabolomique ciblée, d'une part, permet de quantifier de manière très précise plusieurs métabolites dans un échantillon. Cependant, il est nécessaire de bien connaître la structure des métabolites cibles. Elle peut être utilisée dans un objectif de dérégulation chimique des métabolites. L'approche

non ciblée, d'autre part, permet d'identifier et de quantifier de manière relative tous les métabolites.

C'est cette deuxième approche qui permet d'obtenir une vue d'ensemble des métabolites d'intérêts également appelée « empreinte métabolique ». L'identification des microorganismes serait ainsi basée sur l'analyse et la comparaison de ces empreintes entre elles. On parle alors de chimio-taxonomie. Tous les composés ne peuvent pas être utilisés en chimio-taxonomie, même si ces derniers ont une importance pour le champignon filamenteux. Le profil doit être basé sur des métabolites spécialisés spécifiques possédant un pouvoir de discrimination, également appelés, métabolites bio-marqueurs. En revanche, des composés sans pouvoir de discrimination, parce que présents chez tous les champignons tels que les métabolites primaires ou constitutifs par exemple, ne présentent pas ou peu d'intérêt dans cette approche. C'est le cas notamment de l'ergostérol présent dans les parois cellulaires de toutes les espèces fongiques.

4.2. Méthode

Tout d'abord, le développement du champignon filamenteux doit être réalisé dans des conditions standardisées et contrôlées au laboratoire comme la température, l'hygrométrie, la luminosité ainsi que le temps d'incubation par exemple. Les milieux de culture de type CYA et Yeast extract Sucrose (YES) sont optimaux pour la production de la plupart des métabolites et notamment ceux des *Penicillium* après une incubation de 7 jours à 25°C dans le noir (Visagie et *al.*, 2014). Ensuite, une extraction des métabolites produits par la souche fongique d'intérêt est réalisée à l'aide d'un mélange de solvants organiques comme par exemple le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le méthanol (Visagie et *al.*, 2014). Enfin, les métabolites extraits sont séparés par techniques chromatographiques et analysés par spectrométrie de masse.

4.2.1. Chromatographie

La séparation des différentes molécules a pour objectif de faciliter leur identification. Plusieurs techniques de séparation existent mais la plus répandue est la chromatographie. Le principe de cette technique repose sur l'entraînement de l'échantillon, contenant un mélange de métabolites, par une phase mobile au contact d'une phase stationnaire. Ainsi, chaque métabolite migrera à une vitesse différente en fonction de ses caractéristiques physico-chimiques et de la nature des deux phases. La technique classique pour cette séparation est la chromatographie liquide haute performance (CLHP). Il existe plusieurs phases stationnaires et

le choix des phases est spécifique à la nature des molécules à séparer. La chromatographie en phase gazeuse (CPG) peut être utilisée lorsque les métabolites sont volatils et thermostables. La détection des pics séparés lors de la chromatographie se fera par spectrométrie de masse : on parle alors LC-MS (liquid chromatography mass spectrometry) et GC-MS (gas chromatography mass spectrometry) selon le type de chromatographie couplée à la spectrométrie de masse.

4.2.2. Spectrométrie de masse

L'identification des différents métabolites est obtenue *via* l'utilisation de la technologie de spectrométrie de masse. Comme nous l'avons vu précédemment pour la spectrométrie MALDI (cf. paragraphe n° 3.2.2, p 72), elle permet la séparation des molécules en fonction de leur rapport m/z grâce à la variation de courant et de champ électrique. Les molécules doivent donc être chargées pour être séparées. Pour cela, il existe différents types de source d'ionisation et le choix est réalisé en fonction de la nature et des propriétés des métabolites à analyser. Un schéma général d'un spectromètre de masse est présenté en Figure 32.

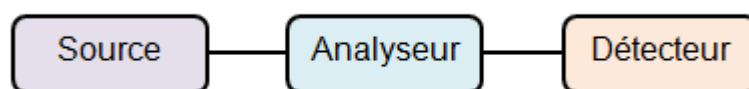


Figure 32 : Schéma général d'un spectromètre de masse

Un spectromètre de masse est composé de trois parties distinctes : (1) la source dans laquelle les molécules sont ionisées, libérées du solvant et transférées vers l'analyseur ; (2) l'analyseur qui sépare les ions en fonction de leur rapport m/z ; (3) le détecteur, qui permet la détection et transforme les signaux ioniques en signaux électriques, traités ensuite par l'informatique.

Les spectromètres de masse haute résolution (HRMS, *High Resolution Mass Spectrometry*) vont permettre d'obtenir des rapports m/z précis (4 ou 5 chiffres après la virgule) et donc des propositions de formules brutes associées à chaque ion détecté. Ces instruments de haute précision sont donc indispensables pour développer des approches métabolomiques.

4.2.3. Analyse des données

La chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-HRMS) permet d'obtenir des empreintes métabolomiques ou chromatogrammes bruts assez complexes qui seront difficiles à comparer visuellement entre eux. En effet, sous chaque pic chromatographique plusieurs ions peuvent être présents (différents adduits d'une même molécule, ions du bruit de fond, ions provenant des milieux de culture par exemple) rendant l'analyse complexe pour l'opérateur. Il est donc indispensable de passer par une étape de retraitement de ces données pour supprimer les ions indésirables et simplifier les chromatogrammes. La Figure 33 est un exemple de la superposition de trois chromatogrammes d'extraits bruts de champignons filamenteux.

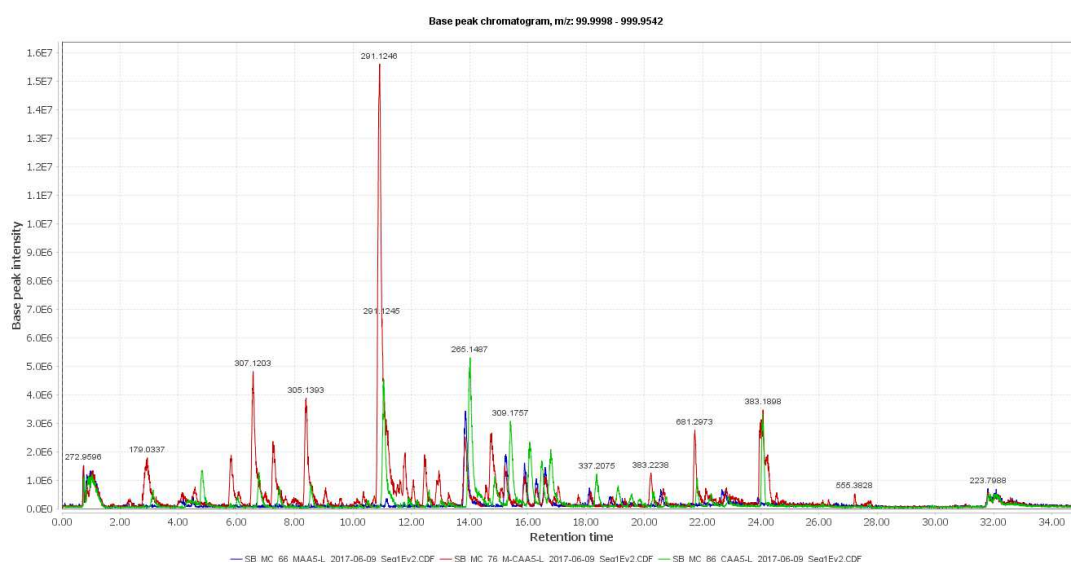


Figure 33 : Comparaison par superposition de trois chromatogrammes d'extraits bruts de champignons

Les extraits bruts du champignon n°1 (en rouge), du champignon n°2 (en vert) et du champignon n°3 (en bleu) contiennent très probablement des métabolites communs qui sont ionisés et détectés par le spectromètre de masse, bien que leur abondance relative puisse varier, mais aussi d'autres métabolites plus spécifiques de chacune des souches. A ce stade, chaque pic chromatographique contient trois informations : le temps de rétention, le rapport m/z de tous les ions détectés dans ce pic et leur intensité. L'objectif est donc de mettre en évidence les ions discriminants qui pourraient être des biomarqueurs spécifiques de chaque champignon. La sélection de ces ions d'intérêt à partir des chromatogrammes nécessite donc plusieurs étapes d'analyse des données.

La première étape consiste à améliorer la qualité des pics en apportant une correction de base comme l'élimination du bruit de fond lié au milieu de croissance par exemple. Cette

correction est réalisée via la fixation d'une limite au niveau de l'intensité pour chaque spectre de masse obtenu tout au long du chromatogramme (Figure 34).

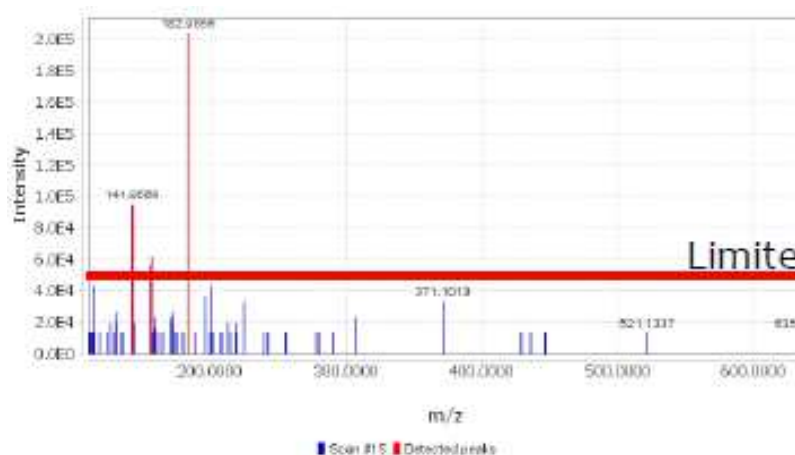


Figure 34 : Elimination du bruit de fond sur un spectre de masse

La deuxième étape consiste à transformer les chromatogrammes traités en une matrice de données exploitables par les outils d'analyse statistique. L'utilisation d'outils bioinformatiques permet la création, la déconvolution et l'alignement des ions de chaque chromatogramme (Figure 35). Parmi les nombreux logiciels d'analyse des données, MZmine[®] et XCMS[®] sont par exemple disponibles en libre accès.

ID	Average		Identity	Comment	Peak shape	SB_MC_62_MAA1-L_2017-06-09_Seg1E2.CDF				SB_MC_75_L	
	m/z	RT				Status	Height	Area		Status	
258	225.7982	14.84				●	1.8E5	7.9E5		●	
274	225.7976	14.70				●	6.3E4	2.3E5		●	
593	288.2275	14.78				●	5.3E4	1.0E5		●	
341	287.2242	14.79				●	3.5E5	2.1E6		●	
796	288.2275	14.82				●	5.3E4	1.0E5		●	
342	287.2241	14.83				●	8.5E4	1.7E5		●	
665	355.2124	14.83				●	2.6E4	1.1E4		●	
536	223.7991	14.84				●	1.8E5	8.3E5		●	
375	225.7957	14.86				●	7.9E4	3.0E5		●	
705	265.1469	14.87				●	2.6E4	1.5E4		●	
68	112.9553	14.98				●	9.9E4	2.8E5		●	
205	221.8011	15.00				●	8.2E4	2.5E5		●	
431	112.9559	15.01				●	1.0E5	3.5E5		●	
695	399.2176	15.04				●				●	
705	190.9305	15.06				●	8.6E4	3.4E4		●	
259	223.7995	15.08				●	1.3E5	8.1E5		●	
276	225.7971	15.10				●	7.6E4	3.6E5		●	
521	221.8007	15.12				●	8.6E4	1.8E5		●	
380	351.2218	15.13				●	1.8E5	4.9E5		●	
663	352.2239	15.16				●	4.6E4	5.4E4		●	
277	225.7968	15.17				●	7.3E4	1.8E5		●	

Figure 35 : Alignement des pics avec le logiciel MZmine[®]

Ainsi, ces étapes de retraitement permettront d'obtenir sous forme d'un tableau, la liste des ions détectés ou non en fonction de leur temps de rétention et de leur abondance relative et ceci pour tous les échantillons analysés. Un code couleur est ainsi obtenu pour chaque ion aligné dans tous les échantillons avec en vert lorsque l'ion est présent, en rouge ; lorsqu'il est absent et en jaune, lorsqu'il est présent mais sous la limite de détection fixée (donc considéré comme étant du bruit de fond).

La troisième étape consiste à réaliser des analyses univariées ou multivariées, supervisées ou non selon qu'elles tiennent compte de l'appartenance à chaque groupe. Une des méthodes les plus utilisées pour l'analyse non supervisée est l'analyse en composante principale (ACP). Pour l'analyse supervisée, c'est la régression *Partial Least Square* couplée à l'analyse discriminante (PLS-DA) (Chao de La Barca et *al.*, 2015). Cette étape a pour objectif de synthétiser et de structurer l'information contenue dans les données mesurées. La Figure 36 représente une analyse non supervisée de type ACP en trois dimensions (projections Axes 1-2 et 1-3).

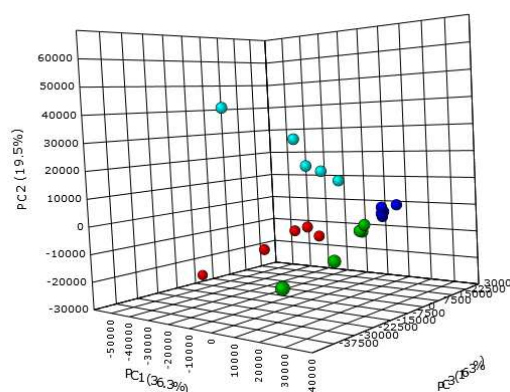


Figure 36 : Exemple d'une ACP obtenue à partir d'extraits bruts (n=5) de quatre champignons filamenteux cultivés sur un milieu identique

Ce type d'analyse permet donc de séparer des champignons par analyse de leur métabolome en mettant en évidence la présence d'ions discriminants pouvant correspondre à des métabolites biomarqueurs. Une sélection des ions d'intérêts/discriminants pourra alors être réalisée. L'identification de ces derniers, sur la base de leur masse exacte obtenue par spectrométrie de masse haute résolution nécessitera une revue de la littérature scientifique si le métabolite est connu et/ou une méthode complémentaire d'identification.

4.2.4. Approche métabolomique appliquée à l'identification des champignons

Dans leur étude, W. Kim et *al.*, 2016 ont comparé le profil métabolique de 45 souches d'*Ascochyta* et de *Phoma* en utilisant l'approche métabolomique non ciblée avec la technique LC-MS. Parmi ces souches, un total de 30 souches réparties en 13 espèces était décrit et un total de 15 souches n'était pas encore complètement caractérisé. Les auteurs ont montré qu'il était possible de différencier l'ensemble des espèces par la comparaison des profils métaboliques excepté pour l'espèce *A. lentis* qui présentait une variabilité trop importante de son métabolome. Des souches comme *A. pisi* et *A. fabae*, présentant des profils métaboliques

très semblables, ont tout de même été différenciées avec succès. Cette étude témoigne de la spécificité métabolique intra espèce importante ainsi que de la variabilité métabolique inter espèce discriminante. Si l'approche métabolomique non ciblée a permis de discriminer les espèces entre elles, en revanche elle n'a pas permis l'identification à l'espèce des espèces non encore caractérisées. Cette étude a plutôt mis en avant les convergences chimio-taxonomiques entre les espèces non caractérisées et les espèces décrites.

4.2.5. Exemples de recherche ciblée de métabolites spécifiques de champignon

Dans certains cas, seule une petite quantité de métabolites peut être nécessaire pour confirmer l'identité d'un isolat fongique et notamment lorsque ces métabolites ont été décrits dans la littérature scientifique comme étant spécifiques d'une espèce ou d'un groupe d'espèces proches. Ainsi, il est possible de les caractériser directement en ligne par analyse LC-HRMS sans les purifier au préalable. Cette approche appelée la déréplication chimique est énormément utilisée pour le genre *Penicillium* afin de rechercher des métabolites secondaires spécifiques de certaines espèces. Afin d'illustrer ces propos, nous allons prendre en exemple différents métabolites de *Penicillium* plus ou moins spécifiques qui peuvent être utilisés pour identifier des isolats de *Penicillium*.

Toutes les espèces de *Penicillium subgenus Penicillium* séries Verrucosa produisent de l'acide arabénoïque (Frisvad et al., 2004). Si ce métabolite est détecté dans un extrait brut, il permettra au mieux de conclure sur la série du *Penicillium* d'intérêt mais en aucun cas sur son identification précise à l'espèce.

D'après Frisvad et Samson, 2004, si l'isolat produit de la griséofulvine et de la roquefortine C par exemple, il pourra être identifié uniquement comme appartenant aux espèces *Penicillium coprophilum*, *P. griseofulvum* ou *P. sclerotigenum*. Ce binôme de métabolites permet donc de réduire de 58 espèces, présentes dans l'étude, à 3 espèces, à l'origine de la production de ces deux métabolites. Si cette réduction semble intéressante, ce binôme de métabolites n'est pas suffisamment discriminant pour permettre l'identification précise de l'espèce recherchée. En revanche, si cet isolat produit également de l'acide cyclopiazonique, il pourra être identifié comme *Penicillium griseofulvum*. Ainsi, le trinôme de métabolites permet de discriminer *P. griseofulvum* parmi 58 espèces appartenant au genre *Penicillium* sous-genre *Penicillium*.

Dans l'approche génomique, nous avons vu des exemples d'identification de champignons filamenteux en environnement industriel pharmaceutique. Dans la Figure 25, p 66, le séquençage unilocus du gène codant pour l'ARN 28S présentait des difficultés pour une identification précise à l'espèce de l'échantillon n°3. Quatre espèces différentes de *Penicillium* présentaient une homologie égale à 100%, une espèce présentait une homologie égale à 99,83% et cinq autres espèces présentaient une homologie égale à 99,67%. Parmi ces cinq dernières espèces, une espèce de référence était identique à une autre espèce de référence ayant obtenu un pourcentage d'homologie égale à 100%. Un total de neuf propositions d'espèces était donc proposé. Ces résultats, assez proches et non discriminants, avaient nécessité un séquençage complémentaire, celui du gène de la β -tubuline, afin d'obtenir une identification plus fiable. Selon la même démarche, l'approche métabolomique ciblée peut être utilisée. Le Tableau 15 présente les différentes familles de métabolites produits par les neuf espèces identifiées par séquençage unilocus de l'échantillon n°3 d'après les données extraites de Frisvad et *al.*, 2004.

Tableau 15 : Familles de métabolites produits par neuf espèces de *Penicillium* (adapté d'après Frisvad et *al.*, 2004)

	Pourcentage d'homologie obtenu par séquençage moléculaire (en %)	Anadin	Asperfulan	Asperic acid	Aseltoxin	Aurantine	Aurantiamine	Chanocavine-I	Cycopaldic acid	Cycloperins	Cyclopamide	Cyclopamine	Cyclopiazonic acid	Frequentin	Fulvic acids	Fumigadavines	Griseofulvins	Hadacidins	Met 1	Methyl-4-(2-(2R)-hydroxy-3-butyryloxy)benzoate	Mycelianamide	Nephrotoxic glycopeptides	Norlichexanthone	Palitatin	Patulin	Patulins	Penicillic acid	Penicillins	Pentremis	Pseurotrins	Puberulins	Roquefortine C	Rugulovasines	TAN-1612	Terrestic acid	Verrucofortins	Verrucosidins	Xanthomegrins
<i>P. commune</i>	100 et 99,87								+	+			+	+					+					+								+						
<i>P. polonicum</i>	100	+		+						+										+	+					+									+	+	+	
<i>P. tricolor</i>	100				+																														+	+	+	
<i>P. griseofulvum</i>	100							+			+	+	+		+		+				+				+	+	+				+		+					+
<i>P. aurantiogriseum</i>	99,83	+				+	+															+					+	+							+	+		
<i>P. camembertii</i>	99,67												+					+	+																			
<i>P. clavigerum</i>	99,67		+										+										+							+								
<i>P. palitans</i>	99,67												+			+								+		+												
<i>P. corylophylum</i>	99,67																																					

Un total de 37 familles de métabolites a été décrit pour l'ensemble de ces neuf espèces. Un « + » est présent lorsque le métabolite est produit par l'espèce. Un code couleur a été mis en place en fonction de l'intérêt du métabolite dans notre étude. Si le métabolite est produit par plusieurs espèces (en rouge), il ne permettra pas de réaliser une discrimination précise de notre échantillon n°3. C'est le cas, par exemple, des métabolites de la famille des acides cyclopiazoniques produits à la fois par *Penicillium commune*, *P. griseofulvum*, *P. camembertii*, *P. clavigerum* et *P. palitans* ou encore de la famille des anacines produites par *P. polonicum* et *P. aurantiogriseum*. En revanche, si le métabolite est produit par une seule espèce (en vert), il sera plus spécifique de l'espèce et donc discriminant pour l'identification de l'échantillon n°3. C'est le cas, par exemple, des métabolites de la famille

des fumicaglavines pour *P. palitans* et de la famille des hadacidines pour *P. camembertii*. Nous savons, grâce au séquençage complémentaire du gène de la β -tubuline, que l'échantillon n°3 est un *Penicillium griseofulvum*. Dès lors que nous rechercherons dans l'extrait brut un des métabolites de la famille de la chanoclavine-I, des cyclopiamides, des cyclopiamines, de l'acide fulvique, des griseofulvines, des mycelianamides, des patulidines, des pénicillines ou des roquefortines C, l'identification de l'échantillon n°3 serait confirmée par l'approche métabolomique ciblée.

Néanmoins, une des limites de cette approche, à ce jour, est que le nombre de métabolites biomarqueurs est restreint. C'est le cas notamment de *Penicillium corylophylum* dont aucun métabolite n'a été identifié (cf. Tableau 15, p 85). Dans ce cas, les métabolomes entiers peuvent être comparés par l'approche métabolomique non ciblée.

Dans leur étude, Kim *et al.* (Kim, Park, et Lee, 2012) ont comparé le profil métabolique de quatre espèces de *Penicillium*, à savoir *P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. solitum* et *P. oxalicum*, représentées par un total de 17 souches en utilisant les techniques LC-MS et GCMS. Ils ont montré que *P. oxalicum* pouvait être différencié des trois autres espèces grâce à ces principaux métabolites que sont les glandicolines A et B, la meleagrine et l'oxaline. La meleagrine possède une activité antibiotique alors que les trois autres composés sont des mycotoxines bien connues des espèces de *Penicillium subgenus Penicillium* (Frisvad et Samson, 2004). *Penicillium expansum* s'est lui différencié par un autre biomarqueur, les andrastines A, B et C. La déréplication chimique pour rechercher la présence d'un métabolite biomarqueur spécifique d'une espèce s'avère donc un outil intéressant, à partir de simple extraits bruts de champignons, pour apporter des informations chimio-taxonomiques.

4.3. Intérêts et limites

L'identification basée uniquement sur l'approche métabolomique n'est pas encore possible pour toutes les espèces de *Penicillium*. Plus de 10000 métabolites secondaires seraient recensés chez les *Aspergillus* et *Penicillium* dont moins de 10% seraient connus (Smedsgaard et Nielsen, 2005). Cette méthode reste donc prometteuse pour l'avenir lorsque les futures bases de données seront mieux développées (Visagie *et al.*, 2014).

La production de métabolites secondaires est dépendante du milieu sur lequel le champignon filamenteux va se développer (Frisvad *et al.*, 2004). La comparaison des métabolomes d'un même individu dans des conditions différentes de culture permet donc de mettre en avant l'influence du milieu sur l'activation des voies du métabolisme. Cette

variabilité métabolique est un frein à l'utilisation de la métabolomique pour l'identification fongique. Il est donc très important d'avoir une méthode standardisée ou du moins, d'être en accord avec la littérature scientifique pour mettre en évidence le ou les métabolites d'intérêt qui pourront être utilisés comme biomarqueurs d'une espèce ou d'un groupement d'espèces phylogénétiquement proches.

Pour cela, l'utilisation de l'approche ciblée nécessite une connaissance au préalable des familles des métabolites recherchées voire du métabolite biomarqueur spécifique de l'espèce. Ainsi, une description dans la littérature scientifique s'avère nécessaire. Il s'agit donc d'une limite de cette méthode. De plus, celle-ci sera utilisée de façon complémentaire si l'approche génomique s'avère non discriminante liée au manque de séquences dans les bases de données. Il s'agit d'une méthode longue souvent complexe qui demande de bonnes connaissances en traitement des données et en analyses statistiques.

L'utilisation de l'approche non ciblée engendre un nombre considérable de données qu'il faut ensuite être en mesure d'analyser à l'aide d'outils bioinformatiques (Shulaev, 2006). Elle permet d'obtenir des empreintes métabolomiques, au même titre que les spectres d'empreintes protéomiques utilisés dans l'approche protéomique. Toutefois, il n'existe pas, à l'heure actuelle, de banque de données d'empreintes métabolomiques permettant d'identifier une espèce fongique avec un pourcentage de certitude comme pour l'approche protéomique pour laquelle des bases de données payantes sont fournies par les constructeurs de spectromètres de masse. Cette méthode permet d'étudier et de comparer le métabolome entre plusieurs individus de genres ou d'espèces différents. Elle possède donc un grand potentiel pour la mise en évidence de métabolites discriminants/biomarqueurs chez les champignons à identifier (Theodoridis et *al.*, 2013).

Cette approche complémentaire dans l'identification d'espèces fongiques inconnues nécessite des laboratoires bien équipés et expérimentés. Au vu du nombre de contraintes, cette méthode n'est donc applicable que par des laboratoires spécialisés sous-traitants.

Bien que la détermination de l'empreinte métabolique d'un champignon filamenteux soit un outil intéressant pour la taxonomie, la recherche scientifique et l'ingénierie industrielle (Smedsgaard et Nielsen, 2005), cette approche n'est pas, aujourd'hui, utilisée en routine pour l'identification d'espèce contaminant l'environnement industriel pharmaceutique.

5. Exemple d'une stratégie d'identification des souches fongiques sur un site de production de médicaments stériles

Après avoir présenté les différentes méthodes d'identification qui pouvaient être utilisées pour l'identification des champignons, nous allons voir de manière plus concrète quelle stratégie un site industriel pharmaceutique peut appliquer lorsqu'il se trouve confronté à l'identification de contaminants fongiques.

Pour illustrer cet exemple, nous prendrons le cas concret de la stratégie d'identification développée sur un site de production de médicaments stériles dont l'identité est restée anonyme par souci de confidentialité. Ce site de production est composé de ZAC classées de A à D. Chacune de ces zones présente une limite de contamination microbiologique recommandée dans les textes réglementaires comme les *euGMP* pour l'Europe. Le laboratoire de contrôle qualité ainsi que le service d'assurance qualité du site industriel sont donc dans l'obligation de mettre en place une stratégie d'identification des souches microbiologiques afin de répondre à ces exigences. Leur proposition de stratégie d'identification des souches fongiques est présentée dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Stratégie d'identification des souches fongiques dans l'environnement industriel pharmaceutique

Types de contrôle	Résultats	Identification	Conservation
Contrôles d'environnement classe A Monitoring opérateurs classe A Flacons MFT positifs	Tous	Identification à l'espèce	Congélation
Contrôles d'environnement classe B Monitoring opérateurs classe B	Tous	Identification à l'espèce	Congélation
Contrôles d'environnement classe C	Supérieur au seuil d'action	Identification au genre	Non
Contrôles d'environnement classe D	Supérieur au seuil d'action	Résultat « moisissure »	Non

Sur un site de répartition aseptique, il existe deux activités réalisées dans un environnement classé D. D'une part, le conditionnement de flacons produits, c'est-à-dire qu'ils contiennent du PA mais ces derniers sont alors bouchés et encapsulés : le risque de contamination microbiologique du PA est donc écarté. D'autre part, la MAL où les flacons à l'entrée de la ligne de production sont ouverts. Cependant, ces derniers seront lavés intérieur/extérieur par de l'eau purifiée et de l'air comprimé stérile avant d'être stérilisés par la chaleur sèche dans le tunnel de stérilisation. Le risque de contamination microbiologique du PA est donc, là encore, écarté. Il n'y a donc pas d'intérêt à identifier de manière précise les

microorganismes et donc les champignons filamenteux dans cette zone. Un simple dénombrement sera réalisé sur cet environnement classé D. En cas de dépassement du seuil d'action, établi selon l'historique de l'industriel, les champignons filamenteux pourront être identifiés comme « moisissure ». Cette identification « moisissure » consiste en une simple observation macroscopique. Elle est réalisable directement sur le site de l'industriel pharmaceutique au niveau du laboratoire de contrôle microbiologique.

L'environnement classé C correspond à la porte d'entrée de la ZAC classée B via notamment les sas personnel et/ou matériel par exemple. Il paraît donc logique que l'identification des champignons filamenteux soit plus précise que celle demandée pour une ZAC classée D. C'est pourquoi, lors du dépassement du seuil d'action, une identification au genre est nécessaire. En revanche, les souches fongiques retrouvées dans ces deux premiers environnements, classés C et D, ne nécessitent pas de conservation particulière. L'identification au genre consiste en première intention en une identification phénotypique (macroscopique et microscopique) pour les genres les plus communs comme *Aspergillus*, *Penicillium* ou *Cladosporium*, par exemple. Cette identification est réalisée sur le site de l'industriel pharmaceutique. Si l'identification phénotypique ne permet pas de déterminer le genre de la moisissure contaminant la zone, une identification par empreinte protéomique est réalisée en deuxième intention. Cette étape est actuellement sous-traitée auprès d'une entreprise spécialisée dans l'identification microbienne. Toutefois, le site industriel pris en exemple est équipé au sein de son laboratoire de contrôle qualité d'un spectromètre de masse MALDI-TOF Vitek® et de la suite logiciel qu'il utilise pour l'identification de bactéries par comparaison de spectres protéomiques (cf. Figure 31, page 75). Dans un avenir proche, cette étape pourrait donc être également envisagée directement sur site pour le cas des moisissures. Pour cela, il faudra par contre que les bases d'empreintes protéomiques fongiques proposées par les constructeurs de spectromètres de masse soient suffisamment développées et robustes, ce qui n'est pas encore le cas pour les champignons.

Si aucun résultat probant est obtenu par empreinte protéomique, une identification génomique est réalisée en troisième intention, par un sous-traitant spécialisé. Toutefois, la description macroscopique préalable permet de garder un regard critique sur les résultats.

L'environnement classé B possède des normes microbiologiques plus restrictives. Alors que 50 UFC étaient autorisées sur une boîte de sédimentation exposée pendant une durée de 4 heures pour un environnement classé C, seules 5 UFC sont autorisées dans l'environnement classé B, soit une norme 10 fois plus restrictive. La notion de dépassement

du seuil d'action ne rentre donc plus en compte à ce niveau. De plus, l'environnement classé B est l'environnement immédiat de la ZAC classée A. Ainsi, tous les champignons filamenteux retrouvés dans cette zone doivent être identifiés à l'espèce et une conservation de l'intégralité de ces souches sera réalisée par congélation. L'identification précise au niveau de l'espèce se fera uniquement par approche génomique par séquençage et un envoi est réalisé chez un sous-traitant spécialisé dans les identifications fongiques. En effet, l'industriel pharmaceutique pris en exemple n'est pas équipé pour ce genre d'identification pour des raisons évidentes de coûts d'investissement, de consommables (réactifs, amorces, kit de séquençage etc.) et de personnels qualifié en génomique fongique. L'envoi de l'échantillon chez le sous-traitant spécialisé et audité est économiquement plus intéressant dans un contexte où la réduction des coûts de production est plus que jamais d'actualité.

Enfin, l'environnement classé A est l'environnement le plus critique puisque les flacons stériles sont ouverts et dosés dans cette partie du processus. Les normes sont donc très strictes : aucun organisme n'est permis dans cet environnement. Ainsi, tous les champignons filamenteux retrouvés dans cette zone doivent être identifiés à l'espèce et une conservation de l'intégralité de ces souches sera réalisée par congélation. Comme c'est le cas pour l'environnement classé B, l'identification à l'espèce consistera en une identification génomique par séquençage non réalisée sur le site de l'industriel pharmaceutique mais sous-traitée.

Si l'ensemble de ces approches, phénotypique, protéomique ou génomique, présente des limites dans l'identification d'un champignon filamenteux contaminant, et donc ne permet pas une discrimination entre plusieurs espèces, l'approche métabolomique ciblée *via* la dérégulation chimique pourrait être envisagée. Comme nous l'avons montré précédemment, la recherche de métabolites d'intérêt chez le genre *Penicillium* par exemple peut apporter des compléments d'information et aider au diagnostic (*cf.* Tableau 15 page 85). Toutefois, cette méthode nécessite que des métabolites spécifiques à chacune de ces espèces soient décrits. A ce jour et à notre connaissance, cette approche n'est pas encore développée même dans les laboratoires sous-traitants spécialisés dans les identifications de microorganismes et il faudrait donc avoir recours à des laboratoires académiques spécialisés dans ce domaine.

Conclusion

En plus des bactéries, les champignons filamenteux représentent un risque de contamination avéré en environnement industriel pharmaceutique. Pour un site de production, cette contamination représenterait jusqu'à soixante isolats par an. Les genres les plus fréquemment rencontrés sont au nombre de trois et représentent à eux seuls près de 70% des moisissures rencontrées en industrie pharmaceutique. Il s'agit du genre *Aspergillus* à hauteur de 26%, du genre *Cladosporium* à hauteur de 22% et du genre *Penicillium* à hauteur de 22%.

Ces contaminations peuvent engendrer des conséquences plus ou moins importantes. Pour l'industriel, le refus d'un lot de médicaments stériles contaminés par exemple, pourrait entraîner des pertes financières. Pour le patient, l'administration d'un médicament contaminé peut être à l'origine, par exemple, de simples réactions allergiques bénignes, dues à la présence de protéines allergisantes produites par certaines espèces de *Cladosporium*, jusqu'au développement d'infections fongiques (aspergilloses) voire de cancers, dans des cas extrêmes, avec l'aflatoxine B1 produite par certaines espèces d'*Aspergillus*.

Cette problématique impose donc la nécessité d'apporter une identification rapide du champignon filamenteux contaminant l'environnement afin de mettre en place une action efficace face à la contamination rencontrée. Or, ce qui peut être réalisé dans un laboratoire de recherche, entièrement équipé et spécialisé en mycologie, est différent de ce qui sera fait dans un laboratoire aux ressources limitées, ou du moins, dans un laboratoire de contrôle qualité d'un industriel pharmaceutique non équipé pour les identifications fongiques. Ce besoin accroît la nécessité d'avoir de nouveaux outils complémentaires d'identification fongique.

Il s'avère aujourd'hui compliqué d'identifier les champignons filamenteux sur la seule base de leur description morphologique. Les connaissances conséquentes en mycologie qu'exigent cette approche phénotypique, en raison de la complexité de la taxonomie des champignons filamenteux et de la diversité des espèces fongiques, ainsi que le manque de précision et l'aspect chronophage de cette méthode, la rendent inapplicable en routine pour un industriel pharmaceutique. Toutefois, la description morphologique peut être réalisée par le laboratoire de contrôle en première intention pour une identification au niveau du genre dans le cas de moisissures assez communes comme, par exemple, les genres *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Alternaria* qui sont facilement identifiables par du personnel formé en microbiologie. Néanmoins, pour des genres de moisissures moins communs et/ou moins documentés, cette approche peut s'avérer très rapidement limitante.

Depuis plusieurs années, les techniques de biologie moléculaire se sont largement développées et démocratisées. Elles se positionnent donc comme l'outil privilégié dans l'identification grâce notamment à leur fiabilité et leur robustesse. En revanche, ces méthodes basées sur le séquençage moléculaire sont coûteuses et complexes à mettre en œuvre pour un laboratoire non spécialisé au sein du site industriel. Les industries pharmaceutiques se dirigent donc souvent vers des entreprises sous-traitantes spécialisées dans le séquençage d'ADN et la génomique.

Plus récemment, une approche basée sur la protéomique, et plus précisément sur la spectrométrie de masse MALDI-TOF, est apparue comme une alternative pour l'identification des champignons filamenteux, en rapport avec les outils déjà développés par les constructeurs pour les identifications bactériennes. Cette approche répond aux exigences de rapidité, fiabilité et faible coût en terme de réactifs et consommables. Cependant, l'investissement initial pour l'équipement est élevé et les banques de données fongiques sont à l'heure actuelle encore en cours d'optimisation et de développement dans le cadre de collaborations privées entre constructeurs et partenaires industriels spécialisés dans l'identification de microorganismes. Ces implémentations/créations de bases de données, si elles s'avèrent efficaces, seront probablement fournies par les constructeurs lors de l'acquisition de spectromètres de masse ou payantes en équipement supplémentaire. L'inconvénient lié au coût serait alors en partie compensé par l'information fiable et rapide de l'identification permettant un gain de temps dans le processus de libération des lots de médicaments. Cette méthode pourrait donc se révéler intéressante pour combler le manque actuel de méthodes rapides et précises d'identification des champignons filamenteux et ainsi répondre aux enjeux de l'industrie pharmaceutique.

La métabolomique est la dernière des approches dites des « omiques » à avoir fait son apparition. La littérature scientifique et, par conséquent, les bases de données d'identification des champignons filamenteux sont donc, à ce jour, moins développées que les techniques précédentes. De plus, la variabilité importante que connaît le métabolome des champignons filamenteux ne permet pas une identification précise à l'espèce. Cette méthode peut être, en revanche, utilisée dans un but de discrimination d'espèces fongiques permettant ainsi l'apport d'une information complémentaire à une approche d'identification plus fiable mais qui présenterait des limites. Il s'agit donc d'une méthode plutôt orientée recherche qui pourrait s'avérer, dans certains cas, un outil complémentaire d'identification efficace.

Ce travail de thèse a permis de mettre en exergue la complexité de l'identification des champignons filamenteux dans les environnements industriels pharmaceutiques. Cette complexité est due tout d'abord aux champignons eux-mêmes : il n'est pas toujours facile de les identifier même avec les différentes techniques développées à ce jour et l'avancée des connaissances scientifiques. Cette complexité est également liée à l'entreprise elle-même qui n'est pas forcément équipée d'un laboratoire de microbiologie de pointe, d'un laboratoire de biologie moléculaire, d'instruments d'analyse de précision (tels que des spectromètres de masse MALDI ou à haute résolution) voire de personnel qualifié dans des domaines différents et transversaux (mycologie, analyse génomique, protéomique).

Finalement, nous pourrions conclure que pour le cas des champignons filamenteux, il n'existe pas une méthode d'identification fiable à 100%. Ceci est d'autant plus vrai pour les genres assez complexes contenant de nombreuses espèces comme c'est le cas pour les genres *Aspergillus* et *Penicillium*. A l'heure actuelle, seule l'utilisation complémentaire de différentes approches peut permettre d'obtenir le maximum d'informations convergentes qui pourraient fiabiliser les résultats d'identification. Ce constat doit donc être pris en considération par les industries pharmaceutiques qui pourraient être confrontées à des contaminations fongiques.

Bibliographie

- Adl, S.M., Simpson, A.G.B., Farmer, M.A., Andersen, R.A., Anderson, O.R., Barta, J.R., Bowser, S.S., Brugerolle, G., Fensome, R.A., Fredericq, S., James, T.Y., Karpov, S., Kugrens, P., Krug, J., Lane, C.E., et al., 2005. The new higher level classification of Eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J. Eukaryot. Microbiol.* 52, 399–451. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.2005.00053.x>
- Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2009. Évaluation des risques liés à la présence de mycotoxines dans les chaînes alimentaires humaine et animale: rapport final. Agence française de sécurité sanitaire des aliments, 2009, Maisons-Alfort, France.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Amiri-Eliasi, B., Fenselau, C., 2001. Characterization of protein biomarkers desorbed by MALDI from whole fungal cells. *Anal. Chem.* 73, 5228–5231.
- Baldauf, S.L., 2003. The deep roots of Eukaryotes. *Science* 300, 1703–1706. <https://doi.org/10.1126/science.1085544>
- Baldauf, S.L., 1999. A search for the origins of Animals and Fungi: comparing and combining molecular data. *Am. Nat.* 154, S178–S188. <https://doi.org/10.1086/303292>
- Bennett, J.W., Klich, M., 2003. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 497–516. <https://doi.org/10.1128/CMR.16.3.497-516.2003>
- Bensch, K., Braun, U., Groenewald, J.Z., Crous, P.W., 2012. The genus *Cladosporium*. *Stud. Mycol.* 72, 1–401. <https://doi.org/10.3114/sim0003>
- Berbee, M.L., Taylor, J.W., 2001. Fungal molecular evolution: gene trees and geologic time, in: systematics and evolution, *The Mycota*. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 229–245.
- Binder, M., Larsson, K.-H., Matheny, P.B., 2010. Amylocorticiales ord. nov. and Jaapiales ord. nov.: early diverging clades of agaricomycetidae dominated by corticioid forms. *Mycologia* 102, 865–880.
- Botton, B., Breton, A., Collectif, Larpent, J.-P., 1990. Moisissures utiles et nuisibles. Importance industrielle, 2e éd. rev. et complétée. ed. Dunod, Paris.
- Bouchet, P., Guignard, J.-L., Pouchus, Y.-F., 2005. Les champignons: mycologie fondamentale et appliquée. Masson, impr. 2005, Paris, France.
- Bowman, S.M., Free, S.J., 2006. The structure and synthesis of the fungal cell wall. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 28, 799–808. <https://doi.org/10.1002/bies.20441>
- Bullerman, L.B., Bianchini, A., 2007. Stability of mycotoxins during food processing. *Int. J. Food Microbiol., Mycotoxins from the Field to the Table* 119, 140–146. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.035>
- Bush, R.K., Prochnau, J.J., 2004. *Alternaria*-induced asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* 113, 227–234. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.11.023>

- Carlotti, 2014. A3P - Identification des moisissures (La Vague 42). URL <http://www.a3p.org/index.php/articles-techniques-et-scientifiques/1016-identification-des-moisissures.html> (accessed 11.21.16).
- Casset, De Blay, 2008. Effets sur la santé des composés organiques volatils de l'habitat. EM|consulte. URL <http://www.em-consulte.com/rmr/article/162210> (accessed 9.11.17).
- Cavalier-Smith, T., 1998. A revised six-kingdom system of life. Biol. Rev. Camb. Philos. Soc. 73, 203–266.
- Chao de La Barca, J.M., Mirebeau-Prunier, D., Moal, V., Reynier, P., Garnotel, R., Simard, G., 2015. Métabolomique et spectrométrie de masse : de nouvelles perspectives en analyse biomédicale. Ann. Biol. Clin. (Paris) 73, 126–130. <https://doi.org/10.1684/abc.2014.1020>
- Chatellier, S., 2012. A3P - Characterization of bacteria, molds and yeasts by mass spectrometry MALDI-TOF (The Wave 33). URL <https://en.a3p.org/joomla/index.php/articles-techniques-et-scientifiques/1248-caract%C3%A9risation-des-bact%C3%A9ries,-moisissures-et-levures-par-la-spectrom%C3%A9trie-de-masse-maldi-tof-la-vague-33.html> (accessed 5.7.18).
- Chen, H.-Y., Chen, Y.-C., 2005. Characterization of intact *Penicillium* spores by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. Rapid Commun. Mass Spectrom. RCM 19, 3564–3568. <https://doi.org/10.1002/rcm.2229>
- Corradi, N., Hijri, M., Fumagalli, L., Sanders, I.R., 2004. Arbuscular mycorrhizal fungi (Glomeromycota) harbour ancient fungal tubulin genes that resemble those of the chytrids (Chytridiomycota). Fungal Genet. Biol. 41, 1037–1045. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2004.08.005>
- Damon, C., Barroso, G., Férandon, C., Ranger, J., Fraissinet-Tachet, L., Marmeisse, R., 2010. Performance of the COX1 gene as a marker for the study of metabolically active Pezizomycotina and Agaricomycetes fungal communities from the analysis of soil RNA. FEMS Microbiol. Ecol. 74, 693–705. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2010.00983.x>
- Delacharlerie, S., 2008. HACCP organoleptique: guide pratique. Presses Agronomiques de Gembloux.
- Einax, E., Voigt, K., 2003. Oligonucleotide primers for the universal amplification of β -tubulin genes facilitate phylogenetic analyses in the regnum Fungi. Org. Divers. Evol. 3, 185–194. <https://doi.org/10.1078/1439-6092-00069>
- Elidemir, O., Colasurdo, G.N., Rossmann, S.N., Fan, L.L., 1999. Isolation of *Stachybotrys* from the lung of a child with pulmonary hemosiderosis. Pediatrics 104, 964–966.
- Ellis, M.B., 1971. Dematiaceous hyphomycetes. Dematiaceous Hyphomycetes.
- EudraLex - Volume 4 - Good manufacturing practice (GMP) guidelines - European commission, n.d. URL http://ec.europa.eu/health/documents/eudralex/vol-4/index_en.htm (accessed 11.16.16).
- Fischer, G., Braun, S., Dott, W., 2003. Profiles of microfungi--*Penicillium chrysogenum* and *P. expansum*. Int. J. Hyg. Environ. Health 206, 65–67.
- Frew, A.J., 2004. Mold allergy: some progress made, more needed. J. Allergy Clin. Immunol. 113, 216–218. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2003.12.038>

- Frisvad, J.C., Smedsgaard, J., Larsen, T.O., Samson, R.A., 2004. Mycotoxins, drugs and other extrolites produced by species in *Penicillium* subgenus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 49, 201–241.
- Frisvad, J., Samson, R., 2004. Polyphasic taxonomy of *Penicillium* subgenus *Penicillium*. A guide to identification of food and airborne terverticillate *Penicillia* and their mycotoxins. *Stud. Mycol.* 2004, 1–173.
- Garon, D., Guéguen, J.-C., Rioult, J.-P., 2015. Biodiversité et évolution du monde fongique. EDP Sciences, Les Ulis, France.
- Geiser, D.M., Klich, M.A., Frisvad, J.C., Peterson, S.W., Varga, J., Samson, R.A., 2007. The current status of species recognition and identification in *Aspergillus*. *Stud. Mycol.* 59, 1–10. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.59.01>
- GMP Guideline EU GMP Annex 1: Manufacture of sterile medicinal products - revision November 2008. URL http://www.gmp-compliance.org/eca_guideline_120.html (accessed 11.21.16).
- Grandière-Perez, L., Penn, P., Gardembas, M., Boasson, M., 2002. Approche diagnostique non agressive de l'aspergillose pulmonaire invasive en hématologie. Analyse rétrospective d'une série de 16 cas. /data/revues/02488663/v0023i03/01005501/.
- Hawksworth, D.L., 2004. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *ResearchGate* 50.
- Henrissat, B., 2008. Bientôt un champignon pour produire des biocarburants à partir des végétaux - Communiqués et dossiers de presse - CNRS. URL <http://www2.cnrs.fr/presse/communiqués/1340.htm> (accessed 5.7.18).
- Hettick, J.M., Green, B.J., Buskirk, A.D., Kashon, M.L., Slaven, J.E., Janotka, E., Blachere, F.M., Schmechel, D., Beezhold, D.H., 2008. Discrimination of *Penicillium* isolates by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry fingerprinting. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 22, 2555–2560. <https://doi.org/10.1002/rcm.3649>
- Hibbett, D.S., Binder, M., Bischoff, J.F., Blackwell, M., Cannon, P.F., Eriksson, O.E., Huhndorf, S., James, T., Kirk, P.M., Lücking, R., Thorsten Lumbsch, H., Lutzoni, F., Matheny, P.B., McLaughlin, D.J., Powell, M.J., Redhead, S., Schoch, C.L., Spatafora, J.W., Stalpers, J.A., Vilgalys, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycol. Res.* 111, 509–547. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2007.03.004>
- Houbraken, J., de Vries, R.P., Samson, R.A., 2014. Modern taxonomy of biotechnologically important *Aspergillus* and *Penicillium* species. *Adv. Appl. Microbiol.* 86, 199–249. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800262-9.00004-4>
- Houbraken, J., Wang, L., Lee, H.B., Frisvad, J.C., 2016. New sections in *Penicillium* containing novel species producing patulin, pyripyropens or other bioactive compounds. *Persoonia Mol. Phylogeny Evol. Fungi* 36, 299–314. <https://doi.org/10.3767/003158516X692040>
- Hubka, V., Nováková, A., Kolařík, M., Jurjević, Ž., Peterson, S.W., 2015. Revision of *Aspergillus* section *Flavipedes*: seven new species and proposal of section Jani sect. nov. *Mycologia* 107, 169–208. <https://doi.org/10.3852/14-059>
- Identification des *Penicillium*, n.d. URL [http://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Methodes+d%27%C3%A9tudes/Identification+P](http://www.univ-brest.fr/esiabscientifique/Mycologie/Methodes+d%27%C3%A9tudes/Identification+Penicillium)enicillium (accessed 1.3.18).

- ISO 14644-1:1999 - Salles propres et environnements maîtrisés apparentés -- Partie 1: Classification de la propreté de l'air, 1999. . ISO. URL http://www.iso.org/iso/fr/catalogue_detail.htm?csnumber=25052 (accessed 11.21.16).
- ISO 14698-1:2003 - Salles propres et environnements maîtrisés apparentés -- Maîtrise de la biocontamination -- Partie 1: Principes généraux et méthodes, 2003. . ISO. URL http://www.iso.org/iso/fr/catalogue_detail?csnumber=25015 (accessed 11.21.16).
- Keeling, P.J., Luker, M.A., Palmer, J.D., 2000. Evidence from beta-tubulin phylogeny that microsporidia evolved from within the fungi. *Mol. Biol. Evol.* 17, 23–31.
- Kenyon, G.L., DeMarini, D.M., Fuchs, E., Galas, D.J., Kirsch, J.F., Leyh, T.S., Moos, W.H., Petsko, G.A., Ringe, D., Rubin, G.M., Sheahan, L.C., 2002. Defining the mandate of proteomics in the post-genomics era: workshop report ©2002 National Academy of Sciences, Washington, D.C., USA. Reprinted with permission from the National Academies Press for the National Academy of Sciences. All rights reserved. The original report may be viewed online at <http://www.nap.edu/catalog/10209.html>. *Mol. Cell. Proteomics* 1, 763–780.
- Kim, H.Y., Park, H.M., Lee, C.H., 2012. Mass spectrometry-based chemotaxonomic classification of *Penicillium* species (*P. echinulatum*, *P. expansum*, *P. solitum*, and *P. oxalicum*) and its correlation with antioxidant activity. *J. Microbiol. Methods* 90, 327–335. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2012.06.006>
- Kim, W., Peever, T.L., Park, J.-J., Park, C.-M., Gang, D.R., Xian, M., Davidson, J.A., Infantino, A., Kaiser, W.J., Chen, W., 2016. Use of metabolomics for the chemotaxonomy of legume-associated *Ascochyta* and allied genera. *Sci. Rep.* 6. <https://doi.org/10.1038/srep20192>
- Köljal, U., Nilsson, R.H., Abarenkov, K., Tedersoo, L., Taylor, A.F.S., Bahram, M., Bates, S.T., Bruns, T.D., Bengtsson-Palme, J., Callaghan, T.M., Douglas, B., Drenkhan, T., Eberhardt, U., Dueñas, M., Grebenc, T., Griffith, G.W., Hartmann, M., Kirk, P.M., Kohout, P., Larsson, E., Lindahl, B.D., Lücking, R., Martín, M.P., Matheny, P.B., Nguyen, N.H., Niskanen, T., Oja, J., Peay, K.G., Peintner, U., Peterson, M., Pöldmaa, K., Saag, L., Saar, I., Schüßler, A., Scott, J.A., Senés, C., Smith, M.E., Suija, A., Taylor, D.L., Telleria, M.T., Weiss, M., Larsson, K.-H., 2013. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol. Ecol.* 22, 5271–5277. <https://doi.org/10.1111/mec.12481>
- Langille, S., 2013. Particles in Parenteralia - FDA's perspective - ECA Academy. URL <https://www.gmp-compliance.org/gmp-news/particles-in-parenteralia-fdas-perspective> (accessed 5.7.18).
- Lecellier, A., 2013. Détection, caractérisation et identification des moisissures par spectroscopie vibrationnelle infrarouge et Raman. (Thèse de doctorat). Université de Reims Champagne-Ardenne, France.
- Linné, C. von, 1735. Caroli Linnaei, Sveci, Doctoris Medicinae, Systema naturae, sive Regna tria naturae systematice proposita per classes, ordines, genera, & species. Lugduni Batavorum, Apud Theodorum Haak, MDCCXXXV. Ex Typographia Joannis Wilhelmi de Groot, 1735, Pays-Bas.
- Liu, Y., Chang, C.-C.H., Marsh, G.M., Wu, F., 2012. Population attributable risk of aflatoxin-related liver cancer: systematic review and meta-analysis. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* 1990 48, 2125–2136. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2012.02.009>

- Liu, Y.J., Hall, B.D., 2004. Body plan evolution of ascomycetes, as inferred from an RNA polymerase II phylogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 4507–4512. <https://doi.org/10.1073/pnas.0400938101>
- Mapari, S.A.S., Nielsen, K.F., Larsen, T.O., Frisvad, J.C., Meyer, A.S., Thrane, U., 2005. Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Curr. Opin. Biotechnol.* 16, 231–238. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2005.03.004>
- Mermet, N., 2013. La spectrométrie de masse au service des microbiologistes : une révolution en marche ! URL <http://www.animation-debat-conference.fr/wp-content/uploads/2013/03/Publireportage-bioMerieux-Pour-Biologiste-Infos-N%C2%B064-Nathaly-Mermet.pdf> (accessed 5.11.18).
- Microbiological control and monitoring of aseptic processing environments, 2013. . US Pharmacop.
- Mouhamadou, B., Carriconde, F., Gryta, H., Jargeat, P., Manzi, S., Gardes, M., 2008. Molecular evolution of mitochondrial ribosomal DNA in the fungal genus *Tricholoma*: Barcoding implications. *Fungal Genet. Biol.* 45, 1219–1226. <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2008.06.006>
- Murray, P.R., 2012. What is new in clinical microbiology—microbial identification by MALDI-TOF mass spectrometry. *J. Mol. Diagn. JMD* 14, 419–423. <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2012.03.007>
- Neefs, J.M., Van de Peer, Y., De Rijk, P., Chapelle, S., De Wachter, R., 1993. Compilation of small ribosomal subunit RNA structures. *Nucleic Acids Res.* 21, 3025–3049.
- Patterson, S.D., Aebersold, R.H., 2003. Proteomics: the first decade and beyond. *Nat. Genet.* 33, 311–323. <https://doi.org/10.1038/ng1106>
- Paugam, A., Baixench, M.-T., Lebuissan, A., Dupouy-Camet, J., 2010. Diagnostic de l'aspergillose bronchopulmonaire invasive : valeur du dosage du galactomannane dans le lavage bronchoalvéolaire de patients immunodéprimés. </data/revues/03698114/v58i1/S0369811409001503/>.
- PHSS Technical Monograph No 20 Bio-contamination, 2014.
- Pitt, J.I., 2000. Toxigenic fungi: which are important? *Med. Mycol.* 38 Suppl 1, 17–22.
- Pitt, J.I., 1985. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Commonwealth scientific and industrial research organization, Division of Food Research.
- Pitt, J.I., 1979. The genus *Penicillium* & its teleomorphic states: *Eupenicillium* & *Talaromyces*. Academic Press.
- Porquet, D., 2004. Analyse protéomique : stratégies méthodologiques et applications en biologie clinique - PDF. URL <http://docplayer.fr/6079491-Analyse-proteomique-strategies-methodologiques-et-applications-en-biologie-clinique.html> (accessed 5.11.18).
- Raper, K.B., Fennell, D.I., 1965. The genus *Aspergillus*. Williams & Wilkins.
- Reboux, G., 2006. Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Rev. Fr. Allergol. Immunol. Clin.*, 1er Congrès Français d'Allergologie 46, 208–212. <https://doi.org/10.1016/j.allerg.2006.01.036>
- Roland, J.-C., Roland, F., El Maarouf-Bouteau, H., 2008. Atlas biologie végétale. Dunod, DL 2008, Paris, France.

- Ruggiero, M.A., Gordon, D.P., Orrell, T.M., Bailly, N., Bourgoin, T., Brusca, R.C., Cavalier-Smith, T., Guiry, M.D., Kirk, P.M., 2015. A higher level classification of all living organisms. PLoS ONE 10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0119248>
- Samson, R.A., Visagie, C.M., Houbraken, J., Hong, S.-B., Hubka, V., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Susca, A., Tanney, J.B., Varga, J., Kocsubé, S., Szigeti, G., Yaguchi, T., Frisvad, J.C., 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. Stud. Mycol. 78, 141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>
- Samson, R., Seifert, K., Kuijpers, A., Houbraken, J., Frisvad, J., 2004. Phylogenetic analysis of *Penicillium* subgenus *Penicillium* using partial P-tubulin sequences. Stud. Mycol. 2004, 175–200.
- Schoch, C.L., Robbertse, B., Robert, V., Vu, D., Cardinali, G., Irinyi, L., Meyer, W., Nilsson, R.H., Hughes, K., Miller, A.N., Kirk, P.M., Abarenkov, K., Aime, M.C., Ariyawansa, H.A., Bidartondo, M., Boekhout, T., Buyck, B., Cai, Q., Chen, J., Crespo, A., Crous, P.W., Damm, U., De Beer, Z.W., Dentinger, B.T.M., Divakar, P.K., Dueñas, M., Feau, N., Fliegerova, et al., 2014. Finding needles in haystacks: linking scientific names, reference specimens and molecular data for Fungi. Database J. Biol. Databases Curation 2014. <https://doi.org/10.1093/database/bau061>
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Consortium, F.B., List, F.B.C.A., Bolchacova, E., Voigt, K., Crous, P.W., Miller, A.N., Wingfield, M.J., Aime, M.C., An, K.-D., Bai, F.-Y., Barreto, R.W., Begerow, D., Bergeron, M.-J., Blackwell, M., Boekhout, T., Bogale, M., Boonyuen, N., Burgaz, A.R., Buyck, B., Cai, L., et al., 2012a. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. 109, 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schoch, C.L., Seifert, K.A., Huhndorf, S., Robert, V., Spouge, J.L., Levesque, C.A., Chen, W., Fungal barcoding consortium, fungal barcoding consortium author list, 2012b. Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, 6241–6246. <https://doi.org/10.1073/pnas.1117018109>
- Schubert, K., Groenewald, J.Z., Braun, U., Dijksterhuis, J., Starink, M., Hill, C.F., Zalar, P., de Hoog, G.S., Crous, P.W., 2007. Biodiversity in the *Cladosporium herbarum* complex (Davidiellaceae, Capnodiales), with standardisation of methods for *Cladosporium* taxonomy and diagnostics. Stud. Mycol. 58, 105–156. <https://doi.org/10.3114/sim.2007.58.05>
- Shulaev, V., 2006. Metabolomics technology and bioinformatics. Brief. Bioinform. 7, 128–139. <https://doi.org/10.1093/bib/bbl012>
- Simpson, A.G.B., Roger, A.J., 2004. The real “kingdoms” of Eukaryotes. Curr. Biol. 14, R693–R696. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2004.08.038>
- Smedsgaard, J., Nielsen, J., 2005. Metabolite profiling of fungi and yeast: from phenotype to metabolome by MS and informatics. J. Exp. Bot. 56, 273–286. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri068>
- Smit, L.A.M., Bouzigon, E., Bousquet, J., Moual, N.L., Nadif, R., Pin, I., Lathrop, M., Demenais, F., Kauffmann, F., Siroux, V., 2011. Mold allergen sensitization in adult asthma according to integrin $\beta 3$ polymorphisms and toll-like receptor 2/+596 genotype. J. Allergy Clin. Immunol. 128, 185–191.e7. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2011.04.007>

- Sosa, M.U., 2015. Figura 278. Ciclo de vida de *Eurotium rubrum* (Euascomycetes). URL <http://unibio.unam.mx/irekani/handle/123456789/32035?mode=full&proyecto=Irekani> (accessed 6.10.18).
- Stiller, J.W., Hall, B.D., 1999. Long-branch attraction and the rDNA model of early eukaryotic evolution. *Mol. Biol. Evol.* 16, 1270–1279. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026217>
- Tabone, M.D., 2003. Aspergillose pulmonaire invasive chez les enfants immunodéprimés méthodes diagnostiques et classification. *Arch. Pédiatrie*, 19th Annual Meeting of the French Group of Pediatric Infectious Diseases Severe Parasitic and Fungal Infections in Children 10, s582–s587. [https://doi.org/10.1016/S0929-693X\(03\)90041-8](https://doi.org/10.1016/S0929-693X(03)90041-8)
- Tam, E.W.T., Chen, J.H.K., Lau, E.C.L., Ngan, A.H.Y., Fung, K.S.C., Lee, K.-C., Lam, C.-W., Yuen, K.-Y., Lau, S.K.P., Woo, P.C.Y., 2014. Misidentification of *Aspergillus nomius* and *Aspergillus tamarii* as *Aspergillus flavus*: characterization by internal transcribed spacer, β -Tubulin, and Calmodulin gene sequencing, metabolic fingerprinting, and matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* 52, 1153–1160. <https://doi.org/10.1128/JCM.03258-13>
- Tarkka, M.T., Vasara, R., Gorfer, M., Raudaskoski, M., 2000. Molecular characterization of actin genes from homobasidiomycetes: two different actin genes from *Schizophyllum commune* and *Suillus bovinus*. *Gene* 251, 27–35. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00195-5](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00195-5)
- Theodoridis, G., Gika, H., Wilson, I., 2013. LC-MS based nontargeted metabolomics, in: *metabolomics in practice successful strategies to generate and analyze metabolic data*. M. Lämmerhofer and W. Weckwerth, pp. p93–113.
- Valentine, N.B., Wahl, J.H., Kingsley, M.T., Wahl, K.L., 2002. Direct surface analysis of fungal species by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 16, 1352–1357. <https://doi.org/10.1002/rcm.721>
- Verscheure, M., Lognay, G., Marlier, M., 2002. Revue bibliographique : les méthodes chimiques d'identification et de classification des champignons. BASE.
- Visagie, C.M., Houbraken, J., Frisvad, J.C., Hong, S.-B., Klaassen, C.H.W., Perrone, G., Seifert, K.A., Varga, J., Yaguchi, T., Samson, R.A., 2014. Identification and nomenclature of the genus *Penicillium*. *Stud. Mycol.* 78, 343–371. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.09.001>
- Welham, K.J., Domin, M.A., Johnson, K., Jones, L., Ashton, D.S., 2000. Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* RCM 14, 307–310. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0231\(20000315\)14:5<307::AID-RCM823>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0231(20000315)14:5<307::AID-RCM823>3.0.CO;2-3)
- Whittaker, R.H., 1969. New concepts of kingdoms or organisms. Evolutionary relations are better represented by new classifications than by the traditional two kingdoms. *Science* 163, 150–160.
- WHO | Environmental monitoring of clean rooms in vaccine manufacturing facilities, 2012. . WHO. URL http://www.who.int/immunization_standards/vaccine_quality/env_monitoring/en/ (accessed 11.21.16).
- Woese, C.R., Fox, G.E., 1977. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain: the primary kingdoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5088–5090.

Young, S.-H., Castranova, V., 2005. Toxicology of 1 - 3-beta-glucans: glucans as a marker for fungal exposure CRC Press. URL <https://www.crcpress.com/Toxicology-of-1---3-Beta-Glucans-Glucans-as-a-Marker-for-Fungal-Exposure/Young-Castranova/p/book/9780415700375> (accessed 11.27.17).

Vu, le Président du jury,

Yves-François POUCHUS

Vu, le Directeur de thèse,

Nicolas RUIZ

Vu, le Directeur de l'UFR,

Nom - Prénoms : DELAHAYE Thomas, Alain

Titre de la thèse : Champignons filamenteux contaminant l'environnement industriel pharmaceutique : Intérêts et limites des méthodes d'identification actuelles

Résumé de la thèse :

Les champignons filamenteux représentent un risque de contamination avéré en environnement industriel pharmaceutique. Pour un site de production, cette contamination représenterait jusqu'à soixante isolats par an. Les genres les plus fréquemment rencontrés sont *Aspergillus*, *Cladosporium* et *Penicillium*. Ces contaminations peuvent engendrer des conséquences plus ou moins importantes pour l'industriel et pour le patient.

L'enjeu pour l'industriel est donc l'identification fiable et efficace du champignon filamenteux, contaminant son environnement, afin de mettre en place des actions correctives adaptées. Plusieurs stratégies peuvent être envisagées. Ainsi, quatre approches d'identification sont présentées dans ce document : les approches phénotypiques, génomiques, protéomiques et métabolomiques. Pour chacune d'elle, une méthode spécifique est présentée et illustrée d'exemples permettant de mettre en avant les intérêts et les limites respectifs.

Ce travail a permis de mettre en exergue la complexité de l'identification des champignons filamenteux dans les environnements industriels pharmaceutiques. Il n'existe pas, en effet, une méthode d'identification fiable à 100%. Ceci est d'autant plus vrai pour les genres assez complexes contenant de nombreuses espèces comme c'est le cas pour les genres *Aspergillus* et *Penicillium*. A l'heure actuelle, seule l'utilisation complémentaire de différentes approches peut permettre d'obtenir le maximum d'informations convergentes qui pourraient fiabiliser les résultats d'identification. Ce constat doit donc être pris en considération par les industries pharmaceutiques qui pourraient être confrontées à des contaminations fongiques.

MOTS CLÉS : INDUSTRIE PHARMACEUTIQUE, ENVIRONNEMENT, CHAMPIGNONS, CONTAMINATION, IDENTIFICATION

JURY

PRÉSIDENT : Mr Y. F. POUCHUS, Professeur en sciences végétales et fongiques, Faculté de Pharmacie de Nantes

**ASSESEURS : Mr N. RUIZ, Maître de Conférences en botanique et mycologie, Faculté de Pharmacie de Nantes
Mme F. LE GALLOU, Praticien Hospitalier Bactériologie-Hygiène, CHU de Nantes**

Adresse de l'auteur : 21 rue Garengéot, 35500 Vitré