

Méthode analytique

Identification de moisissures cultivables

Responsable technique de la méthode

Audrey Bernèche-D'Amours, M. Sc., RMCCM, microbiologiste agréée
et biochimiste

Personne(s) ayant contribué à la présente version de
cette méthode

Thi Thanh Tam Nguyen, technicienne de laboratoire

Delphine Lanoie, M. Sc., microbiologiste agréée

MA-340





Avis de non-responsabilité

L'IRSST ne donne aucune garantie relative à l'exactitude, la fiabilité ou le caractère exhaustif de l'information contenue dans ce document. En aucun cas l'IRSST ne saurait être tenu responsable pour tout dommage corporel, moral ou matériel résultant de l'utilisation de cette information. Notez que les contenus des documents sont protégés par les législations canadiennes applicables en matière de propriété intellectuelle. Les méthodes d'analyses ou d'étalonnages sont celles mises au point ou retenues par l'IRSST pour l'exécution de ses différents mandats. Elles peuvent requérir l'utilisation de matériels, d'opérations ou d'équipements dangereux. Ces méthodes n'ont pas pour but de mentionner tous les problèmes de sécurité associés avec leur utilisation. C'est la responsabilité de l'utilisatrice et de l'utilisateur d'établir les pratiques de santé et de sécurité appropriées. L'utilisation des données incluses dans ces méthodes se fera aux seuls risques de l'utilisatrice et de l'utilisateur : l'IRSST se dégage de toute responsabilité relative aux erreurs ou aux dommages qui découleraient de telle utilisation et de telle application. Les hyperliens qui apparaissent dans ce document ont été validés au moment de la publication.

Cette publication est disponible en version PDF sur le dépôt institutionnel de l'IRSST, PhareSST.

Dépôt légal

Bibliothèque et Archives nationales du Québec, 2025

ISBN : 978-2-89797-330-8 (3^e édition, 2025)

ISBN : 2-550-35627-6 (1^{re} édition, 2000)

DOI : <https://doi.org/10.70010/BHDW4242>



SUIVI DES MODIFICATIONS

NATURE DE LA MODIFICATION

La présente version de cette méthode est reformatée selon le nouveau gabarit de rédaction des méthodes analytiques. Elle comporte une mise à jour des techniques analytiques utilisées pour identifier les moisissures cultivables au laboratoire de l'IRSST, soient l'ajout de la spectrométrie de masse MALDI-TOF et du séquençage de type Sanger ciblant différents loci génétiques.



AGENT MICROBIEN CIBLÉ

Moisissures cultivables

APPLICABILITÉ

Cette méthode est utilisée pour identifier au genre ou à l'espèce des moisissures cultivées à partir d'échantillons d'air, de surface ou de matrices solides ou liquides. Après avoir isolé une souche de moisissure en culture pure, différentes techniques peuvent être utilisées : l'observation des caractères macroscopiques et microscopiques des colonies et leur comparaison à des clés d'identification de référence, la spectrométrie de masse utilisant la technologie MALDI-TOF et le séquençage de type Sanger ciblant différents loci génétiques. Les identifications obtenues par l'une, plusieurs ou l'ensemble de ces techniques sont ensuite interprétées pour rapporter une identification finale.

LIMITATIONS ET INTERFÉRENCES

La performance de cette méthode peut être influencée par divers éléments :

- La rencontre des conditions de croissance nécessaires au développement des moisissures;
- La présence d'une croissance confluyente ou de microorganismes envahissants sur les milieux de culture, rendant difficile l'isolement en culture pure;
- Le maintien du caractère cultivable d'une souche lors de l'isolement en culture pure;
- Le maintien de l'expression des caractères phénotypiques attendus de la souche soumise à l'identification;
- La capacité de la souche à sporuler sur le type de milieu utilisé, la sporulation étant nécessaire à l'identification par observation des caractères macroscopiques et microscopiques et pouvant influencer les résultats en spectrométrie de masse MALDI-TOF;
- La présence de la moisissure recherchée dans les bases de données interrogées, et la validité des entrées dans celles-ci;
- Un changement de nomenclature qui n'est pas reflété dans les clés d'identification des manuels consultés et/ou dans les bases de données interrogées.



RÉACTIFS ET MATÉRIEL

Isolement en culture pure et observation des caractères macroscopiques et microscopiques

- Géloses à l'extrait de malt ou autres milieux de culture selon les besoins
- Outils de culture mycologique
- Colorant bleu de lactophénol (ou équivalent)
- Manuels de référence (voir Annexe 1)

Spectrométrie de masse MALDI-TOF

- Gélose Sabouraud
- Éthanol absolu
- Acide formique 70 %
- Acétonitrile
- Lames VITEK® MS-DS et matrice VITEK® MS-CHCA

Séquençage de type Sanger

- Trousse d'extraction d'ADN Quick-DNA™ Fungal/Bacterial MiniPrep (D6005, Zymo Research) ou PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent (4318930, Applied Biosystems) (ou équivalent)
- Réactifs et matériel pour le PCR (polymerase chain reaction) d'amplification et nettoyage des amplicons (ou équivalent)
 - Tampon Phusion HF 5X (F-518, Thermo Fisher)
 - Mélange dNTPs 10 mM (R0192, Thermo Fisher)
 - Paires d'amorces 25 µM (voir tableau 3)
 - Polymérase Phusion (F-530L, Thermo Fisher)
 - Plaques de purification MinElute 96 UF PCR (FG3829, QIAGEN)
- Réactifs et matériel pour l'électrophorèse sur gel des amplicons
- Trousse de purification sur gel des amplicons QIAquick PCR & Gel Cleanup Kit (28704, QIAGEN) (ou équivalent) (optionnel)
- Réactifs et matériel pour les réactions de séquençage, précipitation/purification des produits (ou équivalent)
 - Tampon de séquençage BigDye v3.1 5X (4336697, Thermo Fisher)
 - Trousse de séquençage BigDye Terminator v3.1 Cycle (4336917, Thermo Fisher)
 - Amorces 3 µM
 - EDTA 125 mM
 - Acétate de sodium 3M
 - Éthanol absolu
 - Éthanol 70 %
 - Hi-Di Formamide (441457, Applied Biosystems)

APPAREILLAGE

Isolement en culture pure et observation des caractères macroscopiques et microscopiques

- Enceinte de sécurité biologique de catégorie II
- Incubateur (25°C±2°C ou autre température selon les besoins)
- Lampe UV (optionnel)
- Stéréomicroscope, grossissement jusqu'à 12X (optionnel)
- Microscope à lumière transmise muni d'un contraste de phase, grossissement total jusqu'à 1000X

Spectrométrie de masse MALDI-TOF

- Microcentrifugeuse
- Système d'identification microbienne MALDI-TOF VITEK® MS de bioMérieux (incluant la base de connaissances VITEK MS V3.2 ou une version subséquente)

Séquençage de type Sanger

- Thermocycleur T100 de Biorad (ou équivalent)
- Séquenceur SeqStudio Genetic Analyzer de Applied Biosystems
- Logiciel d'analyse de séquence SeqMan Ultra de DNASTar (ou équivalent)



PRÉPARATION DE L'ANALYSE

Étape 1	<p>Isolement en culture pure</p> <p>a) Sous l'enceinte de sécurité biologique, repiquer par une pique centrale sur gélose à l'extrait de malt le nombre prescrit (1, 2, 3 ou toutes) de types de morphologies coloniales différentes observées sur la gélose initiale.</p> <p>b) Incuber la ou les géloses à 25°C ± 2°C pendant 3 à 14 jours, jusqu'à ce que la colonie soit bien développée et/ou que la sporulation soit observée. Au besoin, la sporulation peut être stimulée par exposition à la lumière ou à la lampe UV.</p> <p>c) Confirmer la pureté de la colonie isolée et la correspondance avec la colonie originale de la gélose initiale avant de procéder aux prochaines étapes.</p> <p>Note : D'autres types de milieux de culture et/ou températures d'incubation différentes peuvent être utilisés pour des cas particuliers.</p> <p>Lorsque les étapes d'isolement résultent en une perte de viabilité ou en une culture mixte, le résultat « non isolable » est rapporté.</p>
Étape 2	<p>Observation des caractères macroscopiques et microscopiques (technique 1.a) et 1.b))</p> <p>a) Pour chaque isolat, observer et noter les caractéristiques macroscopiques des colonies (dimension, couleur, texture, pigmentation du milieu, etc.). Utiliser au besoin un stéréomicroscope pour certaines observations plus détaillées, comme l'arrangement et la conformation en 3 dimensions.</p> <p>b) Effectuer un montage humide avec une goutte de colorant bleu de lactophénol et vérifier les caractéristiques microscopiques (taille, texture, forme des conidies, conidiophores, hyphes, etc.) au microscope.</p> <p>c) Au moyen de clés d'identification présentées dans des manuels de référence, procéder à l'identification de la moisissure au genre.</p> <p>Lorsque les observations sont claires, il est aussi possible de proposer une ou quelques espèces.</p> <p>Note : Cette technique permet généralement l'identification jusqu'au genre et rarement jusqu'à l'espèce. Il se peut aussi que les caractéristiques observées ne permettent pas une identification au genre ou que le genre soit inconnu. Il est alors souhaitable de poursuivre l'identification en utilisant les techniques analytiques présentées à l'étape 3.</p>
Étape 3	<p>Poursuivre l'identification en utilisant une ou l'autre (ou la combinaison) des techniques analytiques complémentaires suivantes :</p> <ul style="list-style-type: none">● Identification mycologique par spectrométrie de masse MALDI-TOF (technique 2)● Identification mycologique par séquençage de type Sanger (technique 3) <p>Note : Typiquement, les techniques analytiques sont effectuées dans l'ordre illustré par le schéma ci-dessous. (Figure 1). Il est toutefois possible de combiner ces techniques ou de privilégier une seule technique, en fonction du contexte.</p>
Étape 4	<p>Interprétation finale et résultats rapportés</p> <p>Les résultats obtenus par les diverses techniques employées sont interprétés afin de produire une identification finale au genre ou à l'espèce.</p> <p>Pour une identification à l'espèce, il peut s'avérer pertinent de valider le résultat final en comparant les caractères macroscopiques et microscopiques de l'identification rapportée à ceux notés initialement.</p> <p>En cas de doute sur l'espèce identifiée, il est préférable de ne donner qu'une identification au genre, voire au complexe ou à la section, ou encore d'indiquer, le cas échéant, les espèces qui ne peuvent être discriminées selon les techniques utilisées.</p> <p>Lorsque même le genre de la souche n'a pu être identifié, le résultat « non identifiable » est rapporté.</p>

Un diagramme représentant ces différentes étapes est présenté à la Figure 1.

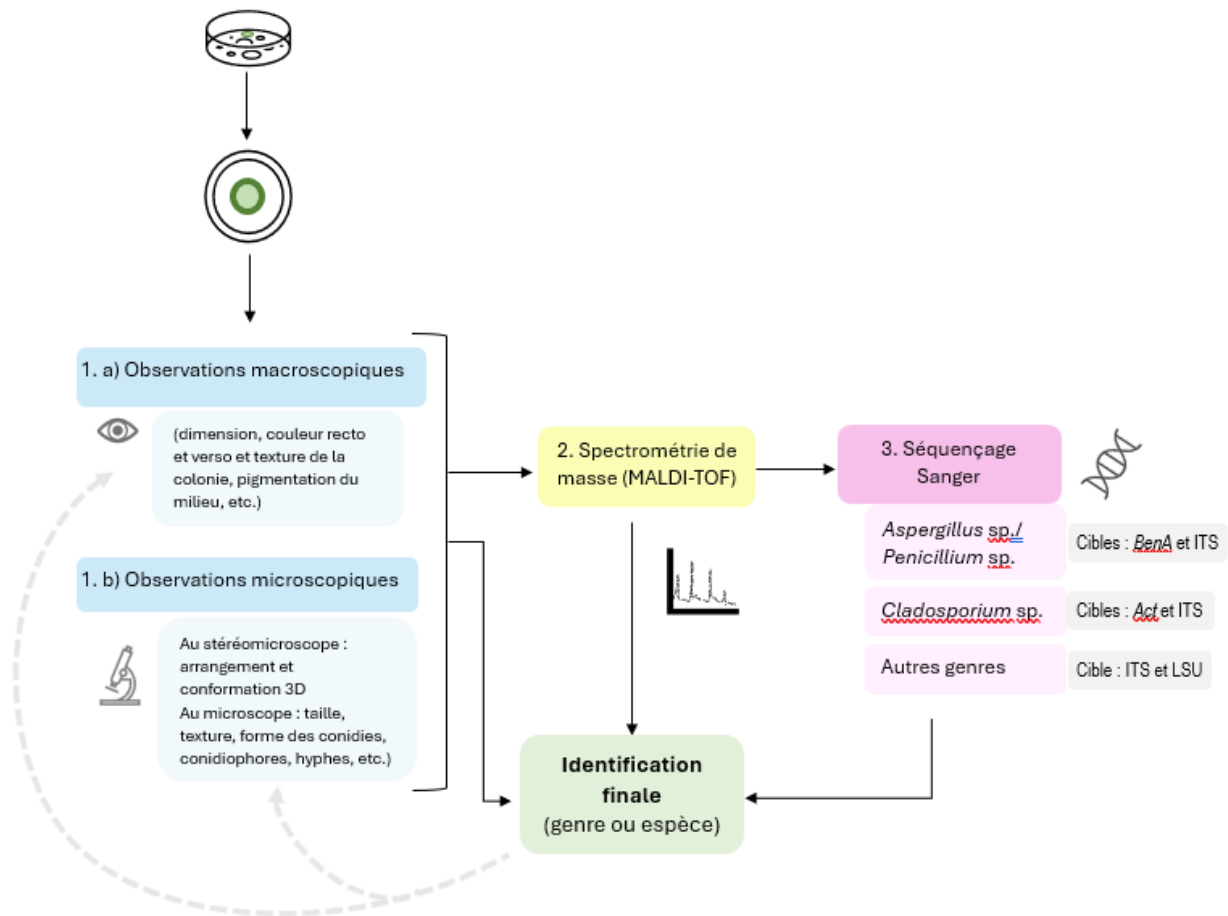


Figure 1. Diagramme représentant le processus d'identification des moisissures cultivables.



TECHNIQUE ANALYTIQUE 2 - IDENTIFICATION MYCOLOGIQUE PAR SPECTROMÉTRIE DE MASSE MALDI-TOF

Principe

Le spectromètre de masse MALDI-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight) permet l'identification de microorganismes (bactéries, levures, moisissures) par l'analyse de leurs profils protéiques. Pour l'identification mycologique, les cellules sont récoltées puis extraites dans l'éthanol, l'acide formique 70% et l'acétonitrile. L'extrait obtenu est déposé sur un point (cible) sur la lame, puis cristallisé par l'ajout d'une matrice. Ce dépôt est par la suite ciblé par le faisceau laser de l'appareil. Les molécules du microorganisme sont alors désorbées, ionisées et accélérées dans un champ électromagnétique, ce qui permet de les séparer en fonction de leur taille. L'appareil mesure le ratio masse/charge de ces molécules en déterminant le temps qu'elles prennent pour traverser le tube de vol. Le profil protéique (spectre) obtenu est ensuite comparé aux spectres de référence d'une base de données, permettant à l'instrument de fournir une identification du microorganisme analysé.

Système et méthodologie

Le système MALDI-TOF utilisé est le VITEK® MS de bioMérieux. Les lames jetables possèdent un code-barre unique et contiennent 48 cibles, séparées en 3 sections de 16 cibles chacune. Le portoir de l'instrument peut recevoir un maximum de 4 lames à la fois, donc, au maximum, 192 analyses peuvent être faites simultanément.

Le protocole concernant l'extraction et la préparation des points sur la lame est une version adaptée de la procédure utilisée par le [BCCM-IHEM](#).

1. Sous l'enceinte de sécurité biologique, les souches à identifier sont repiquées sur gélose Sabouraud et incubées à 25°C (ou autre température selon les besoins) pendant 3 jours ou jusqu'à ce que la colonie soit suffisamment développée et/ou que la sporulation ait débuté.
2. Le mycélium est récolté en prenant soin d'éviter de prélever de la gélose, puis transféré dans un microtube contenant un volume d'eau, auquel est ajouté 3 volumes d'éthanol absolu.
3. Après une étape de vortex, le culot est compacté par centrifugation et séché.
4. Un volume de 50 uL d'acide formique 70% est ajouté au culot, puis mélangé par vortex.
5. Après 5 minutes, l'étape 4 est répétée avec l'acétonitrile.
6. Après 5 minutes, l'extrait est clarifié au moyen d'une centrifugation.
7. Un volume de 1 uL de surnageant est déposé par cible puis séché.
 - a) Généralement, chaque extrait est déposé en 4 répliques (4 cibles) sur la lame, afin d'assurer la répétabilité des résultats d'identification.
8. Un volume de 1 uL de matrice MS-CHCA est ajouté puis séché.
9. Les contrôles suivants sont ajoutés sur chaque lame analysée : un contrôle négatif de lame (eau+ matrice seulement), un contrôle négatif d'extraction (réactifs d'extraction seulement) et un contrôle positif d'une souche de référence (ex : *Aspergillus brasiliensis*).
10. La base de données IVD du VITEK® MS est interrogée automatiquement lors de l'utilisation du système. La base de connaissances en vigueur au moment de la publication de cette méthode est la version 3.2.
11. Les fichiers des spectres générés par le VITEK® MS sont utilisés pour interroger une base de données externe, la plateforme Mass Spectrometry Identification (MSI) (MSI V2.0). Cette plateforme utilise ses propres critères d'interprétation pour fournir une identification au genre ou à l'espèce.

Comme chaque extrait est déposé en 4 répliques (étape 7), nous obtenons 4 identifications par souche, par base de données interrogée. L'identification finale généralement retenue pour chaque base de données interrogée est celle représentant la majorité des résultats obtenus (au moins 3 sur 4).

Commentaires :

Veuillez-vous référer aux instructions du fabricant pour les consignes spécifiques d'utilisation du système VITEK® MS de bioMérieux.

VALIDATION

Les paramètres normalement évalués lors de développement méthodologique (limite de détection et limite de quantification, précision, justesse, récupération et incertitude analytique) ne s'appliquent pas à la présente méthode. Or, un résumé des résultats d'identification obtenus à partir de souches de référence est présenté au tableau 1.


Tableau 1. Résultats de validation- Identification mycologique par VITEK MS couplée à la base de données MSI V2

Genre/espèces analysées (1 souche par espèce, sauf si spécifié entre parenthèses)	Aucune ID	Correcte au genre seulement	À l'espèce		Commentaires
			Correcte	Incorrecte	
Aspergillus sp.					
11 souches, 9 espèces : <i>A. affinis</i> <i>A. brasiliensis</i> (2) <i>A. flavus</i> ^a <i>A. fumigatus</i> ^b <i>A. niger</i> ^b <i>A. oryzae</i> ^a <i>A. sclerotiorum</i> (2) <i>A. sydowii</i> <i>A. versicolor</i>	2/11	2/11 ^b	7/11 ^a	-	^a Bien que comptabilisées comme correctement identifiées à l'espèce, le système ne permet pas de discriminer les espèces <i>A. flavus</i> et <i>A. oryzae</i> . ^b Deux identifications obtenues au genre avec MSI ont été correctement identifiées à l'espèce ou au complexe avec la base de données IVD.
Penicillium sp.					
10 souches, 8 espèces : <i>P. brevicompactum</i> ^c <i>P. chrysogenum</i> ^c <i>P. digitatum</i> <i>P. expansum</i> <i>P. glabrum</i> <i>P. lividum</i> <i>P. purpurascens</i> (2) <i>P. restrictum</i> (2)	-	4/10 ^c	6/10	-	^c Deux identifications obtenues au genre avec MSI ont été correctement identifiées à l'espèce ou au complexe avec la base de données IVD.
Cladosporium sp.					
5 souches, 5 espèces : <i>C. cladosporioides</i> ^d <i>C. halotolerans</i> <i>C. parahalotolerans</i> ^e <i>C. ramotenellum</i> <i>C. sphaerospermum</i>	-	1/5 ^e	3/5	1/5 ^d	^d L'espèce <i>C. cladosporioides</i> a été incorrectement identifiée comme <i>C. westerdijkiae</i> ; considérer limiter l'ID au complexe <i>Cladosporium cladosporioides</i> tel que correctement identifié avec la base de données IVD. ^e Le système ne permet pas d'identifier l'espèce <i>C. parahalotolerans</i> (absente de la base de données MSI V2.0.)
Autres genres					
17 souches provenant de 12 genres : <i>Alternaria alternata</i> ^g <i>Alternaria chartarum</i> <i>Beauveria bassiana</i> ^g <i>Cephalotrichum microsporium</i> <i>Fusarium graminearum</i> ^f <i>Fusarium</i> sp. <i>Marquandomyces marquandii</i> <i>Paecilomyces variotii</i> <i>Phoma glomerata</i> <i>Pleurostoma richardsiae</i> <i>Sarocladium strictum</i> <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> <i>Scopulariopsis candida</i> <i>Stachybotrys chartarum</i> <i>Trichoderma harzianum</i> <i>Trichoderma viride</i> <i>Wallemia sebi</i>	1/17	5/17 ^g	10/17	1/17 ^f	^f L'espace <i>Fusarium graminearum</i> a été incorrectement identifiée comme <i>Fusarium paeoniae</i> . ^g Deux identifications obtenues seulement au genre avec MSI, mais correctement identifiées à l'espèce avec la base de données IVD.
TOTAL- tous genres confondus	3/43 (7,0%)	12/43 (27,9%)	26/43 (60,5%)	2/43 (4,7%)	



TECHNIQUE ANALYTIQUE 3 - SÉQUENÇAGE DE TYPE SANGER

Principe

La technique de séquençage consiste d'abord à extraire et purifier l'ADN du microorganisme à identifier. Par la suite, un segment d'ADN précis, appelé cible moléculaire, est amplifié par PCR. Les brins sont séparés par dénaturation, et avec des amorces de séquençage, une réaction de polymérisation est effectuée sur chacun des brins dénaturés, en utilisant une ADN polymérase, des désoxynucléotides triphosphates (dNTPs) et des didésoxynucléotides triphosphates (ddNTPs) dits « nucléotides de terminaison ». Ces derniers sont marqués d'un fluorophore et ne peuvent pas établir de liaison phosphodiester avec le nucléotide suivant. Lorsqu'un ddNTP s'ajoute aléatoirement à la séquence d'un brin nouvellement synthétisé, cela cause l'arrêt de la polymérisation. Des brins de tailles différentes et marqués d'un fluorophore en leur position terminale sont ainsi obtenus. De façon automatique, par le séquenceur, les fragments amplifiés sont ensuite séparés en fonction de leur taille par électrophorèse et lus au moyen d'un détecteur de fluorescence, permettant d'identifier le type de nucléotide se trouvant en position terminale de chacun des brins. L'appareil fournit donc un chromatogramme qui permet de reconstituer la séquence d'ADN de la cible moléculaire initialement amplifiée. Cette séquence d'ADN est utilisée pour interroger des bases de données, dans lesquelles elle est comparée aux séquences d'ADN référencées de divers microorganismes.

SYSTÈMES ET MÉTHODOLOGIE

1. L'extraction d'ADN s'effectue au moyen d'une trousse d'extraction commerciale, par exemple, Quick-DNA Fungal/Bacterial MiniPrep ou PrepMan™ Ultra Sample Preparation Reagent.
2. Différentes régions géniques à cibler sont proposées en fonction du genre préalablement identifié. (Tableau 2)
 - a. Les amorces permettant de les amplifier sont détaillées au tableau 3.
 - b. D'autres régions géniques pourraient également être utilisées selon les besoins.
3. Un thermocycleur est utilisé pour amplifier la région génique ciblée en utilisant les réactifs suivant (et leur concentration finale) dans le tampon de polymérase (1x) : mélanges de nucléotides (200 µM), paires d'amorces (0,5 µM) et polymérase (0,02 U/µL). Les étapes du programme du thermocycleur sont détaillées au tableau 4.
4. La taille et pureté des amplicons obtenus sont vérifiées sur gel d'agarose.
5. Le nettoyage des amplicons est effectué au moyen d'une trousse commerciale, par exemple MinElute 96 UF PCR Purification kit de Qiagen.
6. Un thermocycleur est utilisé pour effectuer les réactions de séquençage de chaque brin d'ADN (sens et antisens) au moyen d'une trousse commerciale, par exemple BigDye™ Terminator v3.1 Cycle, diluée dans le tampon de séquençage et d'une seule des deux amorces utilisées pour la réaction d'amplification. Les étapes du programme du thermocycleur sont détaillées au tableau 4.
7. Les brins d'ADN marqués sont par la suite purifiés en utilisant la méthode de précipitation éthanol/EDTA/acétate de sodium décrite dans le guide *DNA Sequencing by Capillary Electrophoresis* (Applied Biosystems, 2009).
8. L'étape d'électrophorèse par capillaire est réalisée avec l'analyseur de séquence SeqStudio de Applied Biosystems et permet d'obtenir les séquences.
9. Les paires de séquences (sens et antisens) sont alignées, corrigées et raccourcies en leur extrémités, pour former une séquence consensuelle unique (« contig »), en utilisant un logiciel comme SeqMan Ultra de DNASTar.
10. Les bases de données utilisées pour analyser les séquences obtenues sont les suivantes (Tableau 2):
 - a. NCBI Nucleotide BLAST blastn core nucleotide database (NCBI nt)
 - b. NCBI Nucleotide BLAST blastn rRNA/ITS database/ITS from Fungi type and reference material (NCBI ITS)
 - c. MycoBank database

Tableau 2. Cibles et bases de données proposées en fonction du genre de moisissure identifié

Genre de moisissure préalablement identifié	Cibles	Base de données	Références
<i>Aspergillus</i> sp. / <i>Penicillium</i> sp.	<i>BenA</i> et ITS	NCBI nt ou NCBI ITS	Altschul <i>et al.</i> (1990); National Center for Biotechnology Information (NCBI) (2025)
<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Act</i> et ITS		
Autre genre	ITS et LSU	NCBI nt ou Mycobank	Robert <i>et al.</i> (2005)



Tableau 3. Amorces et séquences correspondantes des cibles proposées

Cible	Amorce	Séquence (5'→3')	Référence	Taille approximative attendue du fragment (pb)
ITS	ITS5	GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G	(CLSI, 2018; Samson et al., 2019; White et al., 1990)	~ 500-600
	ITS4	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		
LSU	NL1	GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG	(O'Donnell, 1993)	~600
	NL4	GGT CCG TGT TTC AAG ACG G		
<i>BenA</i>	Bt _{2a}	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC	(Glass et Donaldson, 1995; Samson et al., 2019)	~ 400-500
	Bt _{2b}	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC		
<i>Act</i>	ACT-512F	ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC	(Carbone et Kohn, 1999)	~ 200-250
	ACT-783R	TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT		

Tableau 4. Programmes d'amplification PCR et de réaction de séquençage proposés

Amplification PCR			Réaction de séquençage		
Étape	Temp. - durée	Répétition	Étape	Temp. - durée	Répétition
Dénaturation initiale	98 °C – 30 s	-	Dénaturation initiale	96 °C – 1 min	-
Dénaturation	98 °C – 10 s	35 X	Dénaturation	96 °C – 10 s	35 X
Hybridation	54 °C – 30 s		Hybridation	50 °C – 5 s	
Élongation	72 °C – 45 s		Élongation	60 °C – 4 min	
Élongation finale	72 °C – 10 min	-	-	-	-
Conservation	4 °C - ∞	-	Conservation	4 °C - ∞	-

Commentaires :

Veuillez-vous référer aux instructions spécifiques des fabricants pour les consignes propres à chaque trousse commerciale utilisée.

VALIDATION

Les paramètres normalement évalués lors de développement méthodologique (limite de détection et limite de quantification, précision, justesse, récupération et incertitude analytique) ne s'appliquent pas à la présente méthode. Or, un résumé des résultats d'identification obtenus à partir de souches de référence est présenté au tableau 5.

À l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus concernant les critères d'acceptabilité pour l'identification mycologique au genre ou à l'espèce par séquençage (CLSI, 2018). Les valeurs obtenues lors de la validation (% d'identité et la base de données avec laquelle la plus grande proportion des identifications a été obtenue) sont mentionnées à titre indicatif en commentaire au tableau 5.



Tableau 5. Résultats de validation- Identification mycologique par séquençage de type Sanger

Genre/espèces analysées (1 souche par espèce sauf si spécifié entre parenthèses)	Cible 1			Cible 2			Commentaires
	Au genre seul- Correcte	À l'espèce		Au genre seul- Correcte	À l'espèce		
		Correcte -Choix unique	Parmi quelques choix/ Incorrecte		Correcte -Choix unique	Parmi quelques choix/ Incorrecte	
Aspergillus sp.	BenA			ITS			
16 souches, 15 espèces : <i>A. brasiliensis</i> <i>A. penicillioides</i> <i>A. candidus</i> <i>A. restrictus</i> <i>A. flavus</i> <i>A. sclerotiorum</i> (2) ^a <i>A. fumigatus</i> <i>A. sydowii</i> <i>A. niger</i> <i>A. terreus</i> <i>A. ochraceus</i> <i>A. unguis</i> <i>A. oryzae</i> <i>A. versicolor</i> <i>A. ostianus</i>	0/15	12/15	3/15 0/15	0/16	10/16	6/16 0/16	^a Une séquence de <i>A. sclerotiorum</i> de mauvaise qualité pour la cible <i>BenA</i> . Critères généraux: • <i>BenA</i> : > 97% d'identité; NCBI nt (13/15) • <i>ITS</i> : > 99% d'identité; NCBI nt (12/16)
Penicillium sp.	BenA			ITS			
16 souches, 14 espèces : <i>P. aurantiogriseum</i> <i>P. echinulatum</i> <i>P. brevicompactum</i> <i>P. expansum</i> <i>P. chrysogenum</i> <i>P. glabrum</i> <i>P. commune</i> <i>P. lividum</i> <i>P. corylophilum</i> <i>P. purpurascens</i> (2) <i>P. crustosum</i> <i>P. restrictum</i> (2) <i>P. digitatum</i> <i>P. spinulosum</i>	0/16	14/16	2/16 0/16	4/16	9/16	3/16 0/16	Critères généraux: • <i>BenA</i> : > 97% d'identité; NCBI nt (16/16) • <i>ITS</i> : > 99% d'identité; NCBI nt (14/16)
Cladosporium sp.	Act			ITS			
9 souches, 7 différentes espèces : <i>C. allcinum</i> ^b <i>C. parahalotolerans</i> ^c (<i>C. sphaerospermum</i>) <i>C. pulvericola</i> <i>C. cladosporioides</i> (2) ^c <i>C. ramotenellum</i> (2) <i>C. halotolerans</i> <i>C. sphaerospermum</i>	0/8	6/8	0/8 2/8 ^c	0/9	6/9	3/9 0/9	^b Une séquence de <i>C. allcinum</i> de mauvaise qualité pour la cible <i>Act</i> . ^c Identification incorrecte à l'espèce pour une souche de <i>C. cladosporioides</i> et <i>C. parahalotolerans</i> avec <i>Act</i> . Critères généraux: • <i>Act</i> : > 96% d'identité; NCBI nt (8/8) • <i>ITS</i> : > 99% d'identité; NCBI nt (9/9)
Autres genres	LSU			ITS			
20 souches <i>Acremonium polychromum</i> <i>Marquandomyces marquandii</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Paecilomyces variotii</i> <i>Alternaria chartarum</i> <i>Paramyothecium parvum</i> <i>Alternaria tenuissima</i> <i>Phoma herbarum</i> ^d <i>Ascotricha chartarum</i> <i>Pleurostoma richardsiae</i> <i>Beauveria bassiana</i> <i>Sarocladium strictum</i> <i>Cadophora melinii</i> <i>Scopulariopsis brevicaulis</i> <i>Epicoccum nigrum</i> <i>Stachybotrys chartarum</i> <i>Fusarium avenaceum</i> <i>Trichoderma harzianum</i> ^e <i>Fusarium graminearum</i> <i>Trichoderma viride</i>	4/20	11/20	5/20 0/20	3/20	17/20	5/20 0/20	^d Aucune identification avec la cible LSU pour cette souche. Critères généraux: • <i>LSU</i> : > 97% d'identité; MycoBank (16/20) • <i>ITS</i> : > 99% d'identité; NCBI nt (14/20)

Remarque : La validation a été réalisée soit à partir d'une collection d'extraits d'ADN conservés au congélateur, soit à partir de cultures de moisissures dont l'ADN a été nouvellement extrait.



ANNEXE 1- MANUELS DE RÉFÉRENCE UTILISÉS POUR L'IDENTIFICATION DE MOISSURES

- de Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., Ahmed, S. A., Al-Hatmi, A. M. S., Figueras, M. J. et Vitale, R. G. (2020). *Atlas of clinical fungi: the ultimate benchtool for diagnostics* (4^e éd.). Foundation Atlas of Clinical Fungi.
- Pitt, J. I. (2000). *A laboratory guide to common Penicillium species* (3^e éd.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.
- Klich, M. A. (2002). *Identification of common Aspergillus species* (1^e éd.). Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C. et Andersen, B. (2019). *Food and indoor fungi* (2^e éd.). Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.



RÉFÉRENCES

- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W. et Lipman, D. J. (1990). Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, 215(3), 403-410. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(05\)80360-2](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(05)80360-2)
- Applied Biosystems. (2009). *DNA sequencing by capillary electrophoresis* (Guide n° 4305080, 2^e éd.). Applied Biosystems. https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cms_041003.pdf
- Carbone, I. et Kohn, L. M. (1999). A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91(3), 553-556. <https://doi.org/10.1080/00275514.1999.12061051>
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2018). *Interpretive criteria for identification of bacteria and fungi by targeted DNA sequencing* (2^e éd.). CLSI.
- de Hoog, G. S., Guarro, J., Gené, J., Ahmed, S. A., Al-Hatmi, A. M. S., Figueras, M. J. et Vitale, R. G. (2020). *Atlas of clinical fungi: The ultimate benchtool for diagnostics* (4^e éd.). Foundation Atlas of Clinical Fungi.
- Glass, N. L. et Donaldson, G. C. (1995). Development of primer sets designed for use with the PCR to amplify conserved genes from filamentous ascomycetes. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1323-1330. <https://doi.org/10.1128/aem.61.4.1323-1330.1995>
- Klich, M. A. (2002). *Identification of common Aspergillus species* (1^e éd.). Centraalbureau voor Schimmelcultures.
- National Center for Biotechnology Information. (2025). *NCBI BLAST®*. NCBI. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- O'Donnell, K. (1993). Fusarium and its near relatives. Dans D. R. Reynolds et J. W. Taylor (édit.), *The fungal holomorph: Mitotic, meiotic and pleomorphic speciation in fungal systematics* (p. 225-233). CAB international.
- Pitt, J. I. (2000). *A laboratory guide to common Penicillium species* (3^e éd.). Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Division of Food Processing.
- Robert, V., Stegehuis, G. et Stalpers, J. (2005). *The MycoBank engine and related databases*. Westerdijk Fungal Biodiversity Institute. <https://www.MycoBank.org/>
- Samson, R. A., Houbraken, J., Thrane, U., Frisvad, J. C. et Andersen, B. (2019). *Food and indoor fungi* (2^e éd.). Westerdijk Fungal Biodiversity Institute.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. et Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. Dans *PCR protocols: A guide to methods and applications* (p. 315-322). Academic Press.