

Université de Poitiers
Faculté de Médecine et de Pharmacie

ANNÉE 2015

Thèse n°

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE
(Arrêté du 17 juillet 1987)

et

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPÉCIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE
(Décret 88-996 du 19 octobre 1988)

présentée et soutenue publiquement
le 28 septembre 2015 à POITIERS
par **Mademoiselle LECOCQ Camille**

**Mycobiome gastrique :
influence de l'infection à *Helicobacter pylori***

Composition du jury

Président : Madame le Professeur RODIER Marie-Hélène

Membres : - Madame le Professeur IMBERT Christine
- Madame le Docteur DELHAES Laurence
- Madame le Docteur CREMNITER Julie
- Madame le Docteur PERRAUD Estelle

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur BURUCOA Christophe

Le Doyen,

Année universitaire 2014 - 2015

LISTE DES ENSEIGNANTS DE MEDECINE

Professeurs des Universités-Praticiens Hospitaliers

- | | |
|---|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. AGIUS Gérard, bactériologie-virologie2. ALLAL Joseph, thérapeutique3. BATAILLE Benoît, neurochirurgie4. BENSADOUN René-Jean, cancérologie – radiothérapie (en disponibilité 1 an à compter de janvier 2014)5. BRIDOUX Frank, néphrologie6. BURUCOA Christophe, bactériologie - virologie7. CARRETIER Michel, chirurgie générale8. CHEZE-LE REST Catherine, biophysique et médecine nucléaire9. CHRISTIAENS Luc, cardiologie10. CORBI Pierre, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire11. DEBAENE Bertrand, anesthésiologie réanimation12. DEBIAIS Françoise, rhumatologie13. DROUOT Xavier, physiologie14. DUFOUR Xavier, Oto-Rhino-Laryngologie15. EUGENE Michel, physiologie (surnombre jusqu'en 08/2016)16. FAURE Jean-Pierre, anatomie17. FRITEL Xavier, gynécologie-obstétrique18. GAYET Louis-Etienne, chirurgie orthopédique et traumatologique19. GICQUEL Ludovic, pédopsychiatrie20. GILBERT Brigitte, génétique21. GOMBERT Jean-Marc, immunologie22. GOUJON Jean-Michel, anatomie et cytologie pathologiques23. GUILHOT-GAUDEFFROY François, hématologie et transfusion24. GUILLET Gérard, dermatologie25. GUILLEVIN Rémy, radiologie et imagerie médicale26. HADJADJ Samy, endocrinologie et maladies métaboliques27. HAUET Thierry, biochimie et biologie moléculaire28. HERPIN Daniel, cardiologie29. HOUETO Jean-Luc, neurologie30. INGRAND Pierre, biostatistiques, informatique médicale31. IRANI Jacques, urologie32. JABER Mohamed, cytologie et histologie33. JAAFARI Nematollah, psychiatrie d'adultes34. JAYLE Christophe, chirurgie thoracique t cardio-vasculaire35. KARAYAN-TAPON Lucie, cancérologie36. KEMOUN Gilles, médecine physique et réadaptation (en détachement 2 ans à compter de janvier 2014)37. KITZIS Alain, biologie cellulaire38. KRAIMPS Jean-Louis, chirurgie générale39. LECRON Jean-Claude, biochimie et biologie moléculaire40. LEVARD Guillaume, chirurgie infantile41. LEVEZIEL Nicolas, ophtalmologie42. LEVILLAIN Pierre, anatomie et cytologie pathologiques43. MACCHI Laurent, hématologie44. MARECHAUD Richard, médecine interne45. MAUCO Gérard, biochimie et biologie moléculaire46. MEURICE Jean-Claude, pneumologie47. MIGEOT Virginie, santé publique48. MILLOT Frédéric, pédiatrie, oncologie pédiatrique49. MIMOZ Olivier, anesthésiologie - réanimation50. MORICHAU-BEAUCHANT Michel, hépato-gastro-entérologie51. NEAU Jean-Philippe, neurologie52. ORIOT Denis, pédiatrie53. PACCALIN Marc, gériatrie54. PAQUEREAU Joël, physiologie | <ol style="list-style-type: none">55. PERAULT Marie-Christine, pharmacologie clinique56. PERDRISOT Rémy, biophysique et médecine nucléaire57. PIERRE Fabrice, gynécologie et obstétrique58. POURRAT Olivier, médecine interne59. PRIES Pierre, chirurgie orthopédique et traumatologique60. RICCO Jean-Baptiste, chirurgie vasculaire61. RICHER Jean-Pierre, anatomie62. RIGAUD Philippe, neurochirurgie63. ROBERT René, réanimation64. ROBLOT France, maladies infectieuses, maladies tropicales65. ROBLOT Pascal, médecine interne66. RODIER Marie-Hélène, parasitologie et mycologie67. SENON Jean-Louis, psychiatrie d'adultes (surnombre jusqu'en 08/2017)68. SILVAIN Christine, hépato-gastro-entérologie69. SOLAU-GERVAIS Elisabeth, rhumatologie70. TASU Jean-Pierre, radiologie et imagerie médicale71. TOUCHARD Guy, néphrologie72. TOURANI Jean-Marc, cancérologie73. WAGER Michel, neurochirurgie |
|---|--|

Maîtres de Conférences des Universités-Praticiens Hospitaliers

1. ALBOUY-LLATY Marion, santé publique
2. ARIES Jacques, anesthésiologie - réanimation
3. BEBY-DEFAUX Agnès, bactériologie - virologie
4. BEN-BRIK Eric, médecine du travail
5. BILAN Frédéric, génétique
6. BOURMEYSTER Nicolas, biologie cellulaire
7. CASTEL Olivier, bactériologie - virologie - hygiène
8. CATEAU Estelle, parasitologie et mycologie
9. CREMNITER Julie, bactériologie - virologie
10. DAHYOT-FIZELIER Claire, anesthésiologie - réanimation
11. DIAZ Véronique, physiologie
12. FAVREAU Frédéric, biochimie et biologie moléculaire
13. FRASCA Denis, anesthésiologie - réanimation
14. HURET Jean-Loup, génétique
15. LAFAY Claire, pharmacologie clinique
16. SAPANET Michel, médecine légale
17. SCHNEIDER Fabrice, chirurgie vasculaire
18. THILLE Arnaud, réanimation
19. TOUGERON David, hépato-gastro-entérologie

Professeur des universités de médecine générale

GOMES DA CUNHA José

Professeurs associés de médecine générale

BINDER Philippe
VALETTE Thierry

Maîtres de Conférences associés de médecine générale

BIRAULT François
BOUSSAGEON Rémy
FRECHE Bernard
GIRARDEAU Stéphane
GRANDCOLIN Stéphanie
PARTHENAY Pascal
VICTOR-CHAPLET Valérie

Enseignants d'Anglais

DEBAIL Didier, professeur certifié
PERKINS Marguerite, maître de langue étrangère

Professeurs émérites

1. DORE Bertrand, urologie (08/2016)
2. FAUCHERE Jean-Louis, bactériologie – virologie (08/2015)
3. GIL Roger, neurologie (08/2017)
4. MAGNIN Guillaume, gynécologie-obstétrique (08/2016)
5. MARCELLI Daniel, pédopsychiatrie (08/2017)
6. MENU Paul, chirurgie thoracique et cardio-vasculaire (08/2017)

Professeurs et Maîtres de Conférences honoraires

1. ALCALAY Michel, rhumatologie
2. BABIN Michèle, anatomie et cytologie pathologiques
3. BABIN Philippe, anatomie et cytologie pathologiques
4. BARBIER Jacques, chirurgie générale (ex-émérite)
5. BARRIERE Michel, biochimie et biologie moléculaire
6. BECQ-GIRAUDON Bertrand, maladies infectieuses, maladies tropicales (ex-émérite)
7. BEGON François, biophysique, Médecine nucléaire
8. BOINOT Catherine, hématologie - transfusion
9. BONTOUX Daniel, rhumatologie (ex-émérite)
10. BURIN Pierre, histologie
11. CASTETS Monique, bactériologie - virologie – hygiène
12. CAVELLIER Jean-François, biophysique et médecine nucléaire
13. CHANSIGAUD Jean-Pierre, biologie du développement et de la reproduction
14. CLARAC Jean-Pierre, chirurgie orthopédique
15. DABAN Alain, cancérologie radiothérapie (ex-émérite)
16. DAGREGORIO Guy, chirurgie plastique et reconstructrice
17. DESMAREST Marie-Cécile, hématologie
18. DEMANGE Jean, cardiologie et maladies vasculaires
19. FONTANEL Jean-Pierre, Oto-Rhino Laryngologie (ex-émérite)
20. GOMBERT Jacques, biochimie
21. GRIGNON Bernadette, bactériologie
22. GUILLARD Olivier, biochimie et biologie moléculaire
23. JACQUEMIN Jean-Louis, parasitologie et mycologie médicale
24. KAMINA Pierre, anatomie (ex-émérite)
25. KLOSSEK Jean-Michel, Oto-Rhino-Laryngologie
26. LAPIERRE Françoise, neurochirurgie (ex-émérite)
27. LARSEN Christian-Jacques, biochimie et biologie moléculaire
28. MAIN de BOISSIERE Alain, pédiatrie
29. MARILLAUD Albert, physiologie
30. MORIN Michel, radiologie, imagerie médicale
31. POINTREAU Philippe, biochimie
32. REISS Daniel, biochimie
33. RIDEAU Yves, anatomie
34. SULTAN Yvette, hématologie et transfusion
35. TALLINEAU Claude, biochimie et biologie moléculaire
36. TANZER Joseph, hématologie et transfusion (ex-émérite)
37. VANDERMARCO Guy, radiologie et imagerie médicale



PHARMACIE

Professeurs

- CARATO Pascal, Chimie Thérapeutique
- COUET William, Pharmacie Clinique
- FAUCONNEAU Bernard, Toxicologie
- GUILLARD Jérôme, Pharmaco chimie
- IMBERT Christine, Parasitologie
- MARCHAND Sandrine, Pharmacocinétique
- OLIVIER Jean Christophe, Galénique
- PAGE Guylène, Biologie Cellulaire
- RABOUAN Sylvie, Chimie Physique, Chimie Analytique
- SARROUILHE Denis, Physiologie
- SEGUIN François, Biophysique, Biomathématiques

Maîtres de Conférences

- BARRA Anne, Immunologie-Hématologie
- BARRIER Laurence, Biochimie
- BODET Charles, Bactériologie
- BON Delphine, Biophysique
- BRILLAULT Julien, Pharmacologie
- CHARVET Caroline, Physiologie
- DEBORDE Marie, Sciences Physico-Chimiques
- DEJEAN Catherine, Pharmacologie
- DELAGE Jacques, Biomathématiques, Biophysique
- DUPUIS Antoine, Pharmacie Clinique (HDR)
- FAVOT Laure, Biologie Cellulaire et Moléculaire
- GIRARDOT Marion, pharmacognosie, botanique, biodiversité végétale
- GREGOIRE Nicolas, Pharmacologie
- GRIGNON Claire, PH
- HUSSAIN Didja, Pharmacie Galénique (HDR)
- INGRAND Sabrina, Toxicologie
- MARIVINGT-MOUNIR Cécile Pharmaco chimie

- PAIN Stéphanie, Toxicologie (HDR)
- RAGOT Stéphanie, Santé Publique (HDR)
- RIOUX BILAN Agnès, Biochimie
- TEWES Frédéric, Chimie et Pharmaco chimie
- THEVENOT Sarah, Hygiène et Santé publique
- THOREAU Vincent, Biologie Cellulaire
- WAHL Anne, Chimie Analytique

PAST - Maître de Conférences Associé

- DELOFFRE Clément, Pharmacien
- HOUNKANLIN Lydwin, Pharmacien

Professeur 2nd degré

- DEBAIL Didier

Maître de Langue - Anglais

- PERKINS Marguerite,

REMERCIEMENTS

A mon Président du jury

Madame le Professeur Marie-Hélène RODIER,

Pour me faire l'honneur de présider ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et l'assurance de mon profond respect.

A mes juges

Madame le Professeur Christine IMBERT,

Pour avoir accepté de juger cette thèse. Soyez assurée de toute mon estime.

Madame le Docteur Laurence DELHAES,

Pour me faire l'honneur de votre présence au sein de ce jury et pour l'intérêt que vous portez à ce travail. Recevez l'assurance de mon profond respect.

Madame le Docteur Julie CREMNITER,

Pour son enthousiasme, sa motivation communicante et le grand sourire avec lequel elle m'accueille toujours.

Madame le Docteur Estelle PERRAUD,

Pour sa disponibilité, son aide et les conseils apportés au cours de ce travail.

Monsieur le Professeur Christophe BURUCOA, mon directeur de thèse,

Pour avoir été à l'initiative de ce travail et me faire l'honneur de le diriger. Pour sa disponibilité, sa gentillesse et ses précieux conseils mais surtout pour sa confiance et ses discours rassurants.

A tous ceux qui m'ont apporté leur aide

Les techniciennes de virologie, tout particulièrement Isabelle,

Pour votre aide tout au long de ce travail, de la mise en place de la technique jusqu'au passage des échantillons. Sans vos conseils, votre expérience, votre gentillesse et votre disponibilité, ce travail n'aurait pas été possible.

Tout le personnel des laboratoires des CHU de Poitiers, Lille et Niort,
Biologistes, techniciens... Pour votre accueil chaleureux et votre enseignement tout au long de mes stages, ce fût un réel plaisir de travailler avec vous durant mes années d'internat.

A mes co-internes, tout particulièrement Manue, Adeline, Alida et Céline,
Pour tous les moments passés ensemble, au travail et en dehors. Vous avez égayé ces quatre années d'internat avec vos délires, votre bonne humeur et votre gentillesse.

A mes parents,
Pour votre soutien indéfectible durant toutes ces années d'étude, comme tout au long de ma vie. L'éducation que vous m'avez inculquée est sans doute ma plus grande force, l'amour que vous ne cessez de me donner ma plus grande richesse. Je ne vous remercierai jamais assez pour tout ce que vous avez fait, et faites encore, pour moi. Recevez ici toute ma reconnaissance et mon amour.

A Claire, ma sœur,
Pour ton soutien inconditionnel, tes bons conseils et ta capacité à me rassurer.
Pour la confiance que tu me fais en me demandant d'être la marraine d'Antoine.

A Simon, mon frère,
Pour le plaisir que tu as à nous voir tous réunis, ton attention et ta gentillesse.

A Antoine, mon filleul d'amour,
Te regarder découvrir le monde est grisant avec ta bonne humeur, ta curiosité et ton sourire charmeur, surtout quand tu fais des bêtises.

A ma famille,
Pour les bons moments passés ensemble, votre amour et votre soutien sans faille.

A la famille VILLAIN - FAYOUX,

Pour son accueil chaleureux, sa gentillesse et son soutien.

Marine, pour nos papotages, ta patience lors de nos footings et ta gentillesse.

Guillaume, pour ta bonne humeur permanente et les sorties du samedi après-midi à Troin.

A mes amis,

Pour votre présence à mes côtés dans les bons comme dans les mauvais moments. Pour votre bonne humeur et votre joie de vivre si communicative. Pour tous les bons moments passés ensemble, et ceux à venir...

Coralie, pour ta précieuse amitié et la grande preuve d'amour que tu m'as faite cette année en me demandant d'être témoin à ton mariage.

Céline, pour ta force et ton dynamisme si communicatif.

Nicolas, Louise, Sarra, Claire et Vincent, pour toutes ses années passées sur les bancs de la fac, les TP, les fous rires et les bavardages intensifs.

Audrey, ma « jumelle », complice de tant de moments et de voyages depuis le lycée.

Marielle, ma FBFF, tu trouves toujours les mots pour me faire rire ou m'émouvoir, en particulier avec ton humour noir.

A Alexandre, pour ton amour, ton humour et ton soutien. Tu me donnes la force et la confiance pour assurer chaque jour et toi seul sais en quelques mots me redonner le sourire et me faire rire. A tes côtés rien ne me paraît insurmontable.

TABLE DES MATIÈRES

I. INTRODUCTION.....	17
II. GÉNÉRALITÉS	19
A. Règne fongique	19
1. Morphologie, nutrition et sexualité	19
2. Classification	20
3. Rôle écologique	25
4. Pathogénicité humaine	26
B. Mycobiome	28
1. Définition	28
2. Outils d'étude	29
3. Composition du mycobiome [31]	30
4. Rôle du mycobiome et interactions avec son environnement.....	31
5. Perspectives thérapeutiques.....	35
C. Identification moléculaire des champignons	37
1. Méthodes classiques d'identification fongique	37
2. Rappel sur les techniques de biologie moléculaire	38
3. Identification moléculaire des champignons	48
D. <i>Helicobacter pylori</i>.....	54
1. Découverte	54
2. Classification	54
3. Caractères morphologiques et biochimiques.....	54
4. Aspect épidémiologique et mode de transmission.....	55
5. Habitat.....	56
6. Déterminisme pathologique associé à <i>H. pylori</i>	58
7. Pouvoir pathogène.....	60
8. Diagnostic	65
9. Traitement d'éradication	67
III. OBJECTIF	71
IV. MATERIEL & METHODE	73
A. Échantillons utilisés pour la mise au point de la technique	73
1. Collection de levures et champignons filamenteux.....	73
2. Échantillons tissulaires.....	73
B. Échantillons utilisés pour l'étude	74
C. Protocole	76
1. Extraction de l'ADN fongique.....	76
2. Amplification génique	77
3. Séquençage.....	79
4. Analyse des séquences.....	79
5. Analyse statistique.....	80
V. RESULTATS	81
A. Mise au point de la technique d'identification moléculaire	81
1. Extraction manuelle sur cultures fongiques.....	81
2. Extraction thermique « boiling/freezing » sur cultures fongiques	82
3. Étude comparative de quatre méthodes d'extraction sur cultures fongiques.....	87
4. Extraction automatisée des biopsies	88
B. Étude des biopsies gastriques	89
1. Description de la population	89
2. Analyse des résultats de PCR	90

3. Analyse des résultats de séquençage.....	92
4. Synthèse des résultats obtenus	98
5. Résultat des identifications moléculaires par séquençage	100
6. Espèces fongiques identifiées	101
7. Analyse statistique.....	102
VI. DISCUSSION.....	103
A. Mise au point de la technique d'identification moléculaire fongique.....	103
B. Étude des biopsies gastriques	105
C. Influence de la bactérie <i>H. pylori</i>.....	107
D. Genres fongiques identifiés.....	108
E. Mycobiome ou flore de transit ?.....	110
F. Perspectives	112
VII. CONCLUSION.....	113
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	115
RESUME.....	124

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Figure 1 : Arbre phylogénétique des êtres vivants à partir des séquences d'ARN ribosomique, Whittaker, 1969 [3].

Figure 2 : Classification phylogénétique des champignons (d'après [8]).

Figure 3 : Classification phylogénétique des Ascomycètes (d'après [8]).

Figure 4 : Classification phylogénétique des Basidiomycètes (d'après [8]).

Figure 5 : Principe de la technique de PCR.

Figure 6 : Spécificité des ddNTPs « terminateurs de chaîne ».

Figure 7 : Détermination de la séquence nucléotidique par électrophorèse capillaire.

Figure 8 : Electrophorégramme et séquence nucléotidique correspondante.

Figure 9 : Dégagement de lumière par triple réaction chimique à partir du PPI dégagé.

Figure 10 : Code international des nucléotides.

Figure 11 : Complexe génique nucléaire codant pour l'ARNr [79].

Figure 12 : Amorces encadrant les régions ITS [79].

Figure 13 : Amorces encadrant la région LSU [79].

Figure 14 : Amorces encadrant la région SSU [79].

Figure 15 : Amorces encadrant les régions IGS [79].

Figure 16 : Vue en microscopie électronique de formes bacillaires et coccoïdes de *H. pylori* (Cliché : Quellard N, Fernandez B, Service de microscopie électronique, CHU Poitiers).

Figure 17 : Représentation schématique de l'estomac et d'une coupe de la paroi gastrique.

Figure 18 : Ultrastructure de la paroi gastrique (d'après Frexinos *et al.* [95]).

Figure 19 : Déterminisme pathologique associé à *H. pylori* (modifié d'après Wroblewski *et al.*, 2010 [104]).

Figure 20 : Corrélation entre le niveau de sécrétion gastrique, la localisation de la gastrite et l'évolution de l'infection à *H. pylori*.

Figure 21 : Histoire naturelle de l'infection à *H. pylori*.

Figure 22 : Arbre décisionnel de la prise en charge thérapeutique de l'infection à *H. pylori* (modifiée d'après GEFH [113]).

Figure 23 : Étapes de la technique d'identification moléculaire des champignons.

Figure 24 : Couple d'amorce ITS1/ITS4 qui amplifie les régions ITS1 et ITS2 et le gène codant pour l'ARNr 5,8S.

Figure 25 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés après extraction manuelle (Qiagen) de l'ADN à partir de cultures fongiques d'*A. fumigatus* et de *K. heterogenica*

Figure 26 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés après extraction thermique type « boiling/freezing » de l'ADN à partir de cultures fongiques d'*A. fumigatus* et de *K. heterogenica*.

Figure 27 : Séquences nucléotidiques brutes et leurs électrophorégrammes obtenues à partir d'une culture d'*A. fumigatus* et analysées avec le logiciel Bioedit Sequence Alignment Editor.

Figure 28 : Résultats de l'alignement de la séquence consensus obtenues par séquençage à partir d'une culture d'*A. fumigatus* avec des séquences de références de la base de donnée NCBI (Genbank).

Figure 29 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés par PCR ITS à partir de différentes cultures fongiques.

Figure 30 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés : comparaison des différentes méthodes d'extraction de l'ADN sur des cultures fongiques de *K. heterogenica*.

Figure 31 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés à partir de deux biopsies humaines.

Figure 32 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés à partir des biopsies gastriques : PCR négatives (absence de bande).

Figure 33 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés à partir des biopsies gastriques : la présence d'une bande de taille équivalente à 500 pb témoigne de la présence de fragments d'ADN amplifiés dans cet échantillon.

Figure 34 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés à partir des biopsies gastriques : présence de nombreuses bandes de taille équivalente à 200 pb témoignant de la présence de courts fragments d'ADN amplifiés dans ces échantillons.

Figure 35 : Séquences nucléotidiques brutes et leurs électrophorégrammes obtenus à partir d'une biopsie gastrique : résultat exploitable avec alignement optimal des deux séquences et des électrophorégrammes à séquence unique.

Figure 36 : Séquences nucléotidiques brutes et leurs électrophorégrammes obtenues à partir d'une biopsie gastrique : résultat exploitable pour la séquence obtenue avec l'amorce ITS4 mais inexploitable pour celle avec l'amorce ITS1.

Figure 37 : Séquence nucléotidique brute et son électrophorégramme obtenue à partir d'une biopsie gastrique : perte de résolution en début de séquence la rendant inexploitable sur les 24 premières bases.

Figure 38 : Séquences nucléotidiques brutes et leurs électrophorégrammes obtenues à partir d'une biopsie gastrique : résultat inexploitable pour les deux séquences avec des électrophorégrammes à séquences multiples indéchiffrables.

Figure 39 : Résultats de l'alignement des courtes séquences obtenues par séquençage des fragments amplifiés de taille inférieure à 300 pb avec des séquences de références de la base de donnée NCBI (Genbank) : identification d'ADN génomique humain.

Figure 40 : Diagramme de flux

Figure 41 : Genres et espèces des champignons identifiés (en rouge) au sein de la classification fongique.

Tableaux

Tableau 1 : Principales études portant sur la caractérisation du mycobiome humain et utilisant des techniques de séquençage à haut débit (d'après [31]).

Tableau 2 : Recommandations de recherche et d'éradication de *H. pylori* [111].

Tableau 3 : Description de la population des 466 patients analysés.

Tableau 4 : Présentation des résultats des 72 séquençages réalisés à partir des biopsies gastriques.

TABLE DES ABREVIATIONS

ADN	: Acide DésoxyriboNucléique
ADNr	: Acide DésoxyriboNucléique ribosomique
AINS	: anti-inflammatoire non stéroïdien
ARN	: Acide RiboNucléique
ARNr	: Acide RiboNucléique ribosomaux
ATCC	: American Type Culture Collection
BLAST	: Basic Local Alignment Search Tool
BPCO	: BronchoPneumopathie Chronique Obstructive
CBS	: Centraal Bureau voor Schimmelcultures
CCD	: Charge Coupled Device
CHU	: Centre Hospitalier Universitaire
CRT	: Cyclic Reversible Termination
DDJB - NIG	: DNA Data Bank of Japan - National Institute of Genetics
ddNTP	: 2'-3'didésoxyribonucléotide
DGGE	: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis
dNTP	: désoxyribonucléotide
EDTA	: Ethylène Diamine Tétra-Acétique
EMBL	: European Molecular Biology Laboratory
EBI	: European Bioinformatics Institute
E-value	: Expectation value
IARC	: International Agency for Research on Cancer
IGS	: InterGenic Spacer
IL	: InterLeukine
IPP	: Inhibiteur de la Pompe à Protons
ITS	: Internal Transcribed Spacer
LSU	: Large SubUnit
MALT	: Mucosa Associated Lymphoid Tissue
MICI	: Maladies Inflammatoires Chroniques de l'Intestin
NCBI	: National Center for Biotechnology Information
OFRG	: Oligonucleotide Finger Printing of rRNA Genes
OTU	: unité taxonomique opérationnelle
pb	: paire de base
PCR	: Polymerase Chain Reaction
PHRC	: Programme Hospitalier de Recherche Clinique
PPi	: pyrophosphate
PTI	: Purpura Thrombopénique Idiopathique
RFLP	: Restriction Fragment Length Polymorphism
SSU	: Small SubUnit
TBE	: Tris Borate EDTA
TNF	: Tumor Necrosis Factor
UV	: UltraViolet

I. INTRODUCTION

Le « microbiote » humain comprend l'ensemble des communautés microbiennes (bactéries, archéobactéries, protozoaires, champignons et virus) qui colonisent les différents écosystèmes de l'homme. Récemment découverte, la composante fongique de ce microbiote appelée mycobiote reste peu étudiée. De même que pour les bactéries non cultivables du microbiote bactérien, la majeure partie du mycobiote humain est constituée de champignons non cultivables. Ainsi de nouvelles approches indépendantes de la culture, comme les méthodes de biologie moléculaire, développées au cours des vingt dernières années, permettent d'aborder la diversité fongique dans les microbiotes par le biais de leur contenu génique (ou mycobiome). Le séquençage direct des gènes fongiques se place comme la méthode la plus efficace pour ces identifications. Les quelques études déjà publiées dans la littérature montrent que différentes niches du corps humain abritent des populations fongiques spécifiques, décrites comme mycobiome oral, des voies respiratoires, cutané, intestinal et génital. De plus, les champignons et certains profils de « mycobiome » apparaissent désormais impliqués comme cofacteurs potentiels dans la physiopathologie de plusieurs maladies, telles que l'hépatite B, la mucoviscidose et les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (MICI).

La recherche d'un mycobiome gastrique n'a pas encore été réalisée. Cependant l'estomac est connu pour son inhospitalité à cause de son milieu acide (pH aux alentours de 5,5) et la sécrétion du mucus gastrique qui protège l'intégrité du revêtement épithélial. Peu de germes ont les caractéristiques pour survivre et proliférer dans cet environnement hostile. Parmi les bactéries, *Helicobacter pylori* est l'une des seules possédant les deux facteurs nécessaires à la colonisation de l'épithélium gastrique : la mobilité, assurée par ses 5 à 7 flagelles polaires, lui permettant de se déplacer au sein du mucus gastrique et l'uréase, capable de tamponner l'acidité gastrique. Ainsi elle colonise l'estomac de la moitié de l'humanité et représente la cause majeure des pathologies gastroduodénales. En effet, l'infection à *H. pylori* conduit constamment à une inflammation de la muqueuse gastrique appelée gastrite, le plus souvent asymptomatique. Dans 15%

des cas, elle peut évoluer vers des pathologies plus sévères (ulcères, cancers gastriques). L'évolution de la gastrite vers des pathologies sévères répond à des interactions complexes entre les facteurs de virulence bactériens, des facteurs génétiques de susceptibilité individuelle de l'hôte infecté, la localisation de l'infection dans l'estomac et des facteurs environnementaux essentiellement représentés par des pratiques alimentaires.

Notre objectif principal était donc la recherche et la description de ce mycobiome gastrique. Pour ce travail, nous avons besoin d'une technique de détection de l'ADN (acide désoxyribonucléique) fongique et d'identification des champignons précise et efficace, sans culture préalable, sur des échantillons tels que les extraits des biopsies gastriques que nous voulions étudier. Après étude bibliographique, nous avons décidé de mettre en place une technique d'identification moléculaire des champignons par amplification génique et séquençage Sanger avec le couple d'amorces universelles pan fongiques ITS1 et ITS4 (internal transcribed spacer). Nous avons d'abord mis au point et testé cette technique d'identification moléculaire fongique sur une large gamme de champignons, avec différentes méthodes d'extraction et sur différents types d'échantillons avant de passer à l'étude des biopsies gastriques de 466 patients. Les patients de notre étude étaient infectés ou non par la bactérie *H. pylori* et présentaient différentes pathologies gastro-duodénales pouvant être causées par cette infection pro-inflammatoire. Cela nous a permis d'étudier le lien entre la présence fongique au niveau gastrique et l'infection à *H. pylori*. Nous avons également pris en compte d'autres facteurs cliniques et démographiques tels que l'expression clinique des infections à *H. pylori*, l'âge, le sexe et le pays de naissance des patients.

II. GÉNÉRALITÉS

A. Règne fongique

Le règne fongique connaît diverses appellations telles que Champignon, Mycètes ou *Mycota* ou encore Fungi. Environ 100 000 espèces de champignons ont été décrites à ce jour, mais on estime que leur nombre total est proche de cinq millions [1]. Il existe une grande diversité de champignons au sein du vivant.

1. Morphologie, nutrition et sexualité

Les champignons sont des eucaryotes : organismes nucléés. Leur structure primordiale est un thalle dépourvu de pigment assimilateur (chlorophylle), dénommé « mycélium ». Le plus souvent il s'agit d'un système de filaments ramifiés pluricellulaire pouvant atteindre plusieurs mètres (hyphe ou filament mycélien). Ce thalle est parfois réduit à un état unicellulaire (de quelques micromètres chez la levure). Aucune organisation tissulaire véritable n'existe chez les champignons. En l'absence de chlorophylle, les champignons se comportent nécessairement en hétérotrophe vis à vis du carbone et utilisent les matières organiques comme source d'énergie. Incapables d'utiliser l'énergie solaire, ils absorbent de nombreuses molécules carbonées fabriquées par d'autres êtres vivants selon cinq modes de nutrition : le saprophytisme, la symbiose, le commensalisme, le parasitisme et exceptionnellement la carnivorie.

Les champignons se multiplient par voie asexuée ou sexuée. Les éléments de la reproduction asexuée sont des spores diverses aussi appelées conidies nommées selon leur origine ou forme tandis que les éléments de la reproduction sexuée sont des zygospores, des ascospores ou des basidiospores. Les parois cellulaires des champignons sont rigides, elles contiennent divers polysides dont la chitine ($\beta(1-4)$ N-acétyl D glucosamine), ou très rarement de la cellulose ($\beta(1-4)$ D glucose) [2]. Bien qu'ils passent souvent inaperçus, les champignons sont présents dans presque tous les compartiments de l'environnement terrestre, y compris au sein d'organismes vivants avec lesquels ils peuvent entretenir des interactions durables dont le parasitisme n'est qu'une des formes.

2. Classification

En 1969, Whittaker et Margulis [3] ont décrit les cinq règnes du vivant que nous connaissons aujourd'hui : Bactérie, Protozoaire, Végétal, Animal et Champignon (Figure 1).

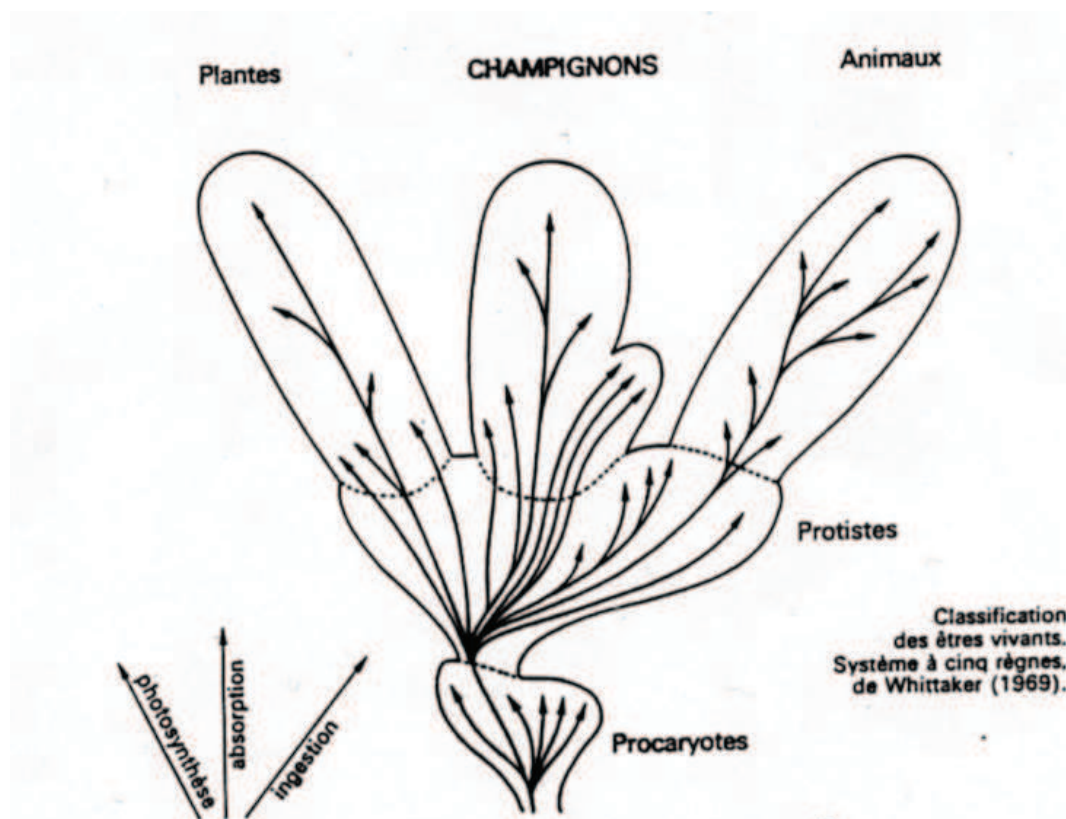


Figure 1 : Arbre phylogénétique des êtres vivants à partir des séquences d'ARN ribosomique décrit par Whittaker en 1969 [3].

La révision de la classification a été proposée par Carl Woese en 1990 après l'observation de grandes différences au niveau moléculaire lors de l'analyse des séquences d'ARN (acide ribonucléique) ribosomique. Woese a entrepris d'établir un système de classification à trois domaines : les Bactéries (ou Eubactéries), les Archées (ou Archéobactéries) et les Eucaryotes, ce troisième domaine regroupant les Plantes, les Animaux, les Protistes et les Champignons [4,5,6].

Une des classifications du règne fongique les plus répandues est celle de Ainsworth GC et Bisby GR initialement présentée dans leur « Dictionary of Fungi » (1971) [7], aujourd'hui profondément remaniée (10^e édition en 2013). Selon cette classification, le règne fongique se divise en cinq divisions : Ascomycètes,

Basidiomycètes, Zygomycètes, Chytridiomycètes et Deutéromycètes. Les divisions se distinguent par le type de reproduction. La classification phylogénétique et la classification traditionnelle ont fait l'objet d'une synthèse qui reprend les divisions classiques phylum, sous-phylum, classe, sous-classe et ordre : «A higher-level phylogenetic classification of the Fungi » [8]. Ce document de 2007, cosigné par 67 auteurs reste une référence (Figure 2).

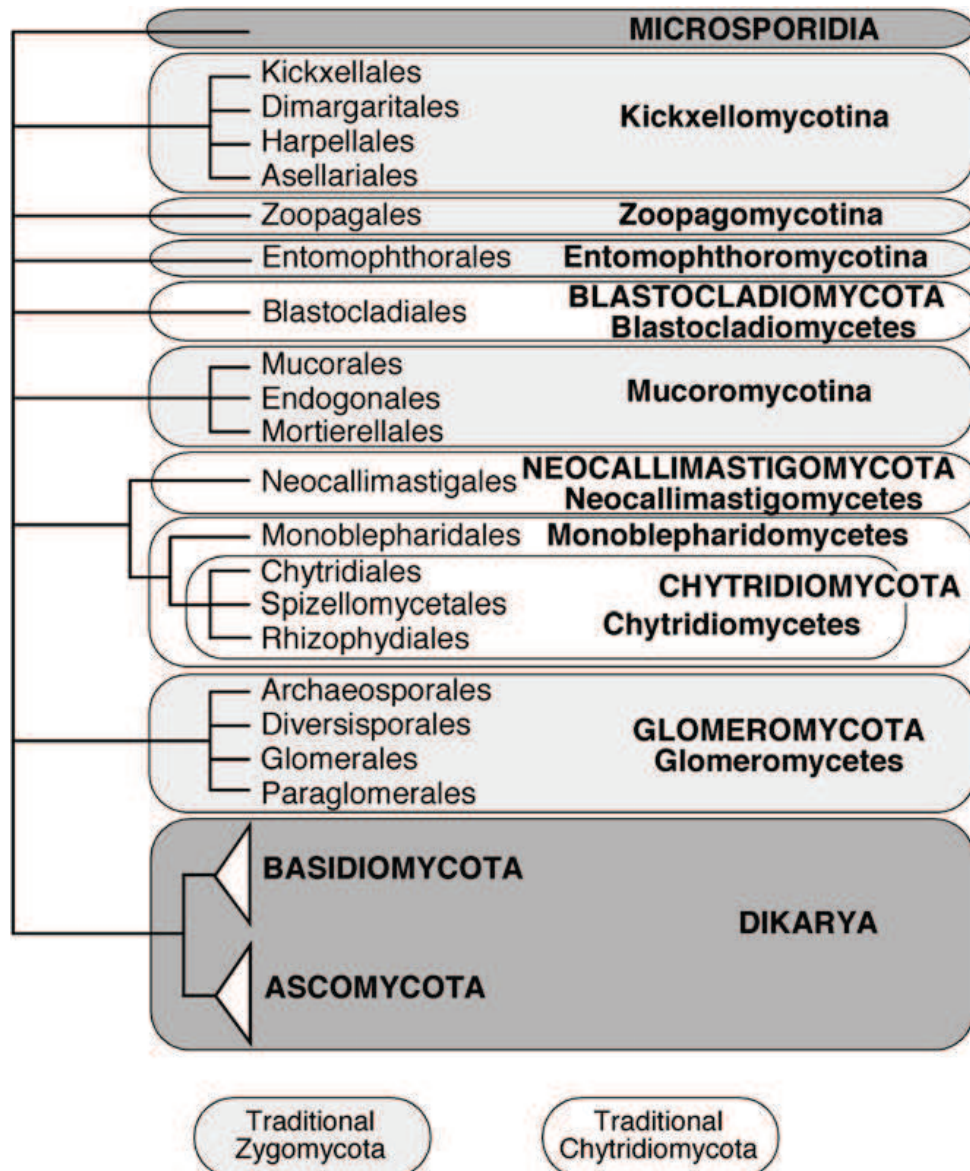


Figure 2 : Classification phylogénétique des champignons [8].

a) Ascomycètes ou *Ascomycota*

Les Ascomycètes présentent une reproduction sexuée grâce aux ascospores formées à l'intérieur de cellules fertiles, les asques, et projetées à maturité à l'extérieur par ouverture de l'asque. Ce sont des saprophytes et nombre d'entre eux sont des parasites (Figure 3).

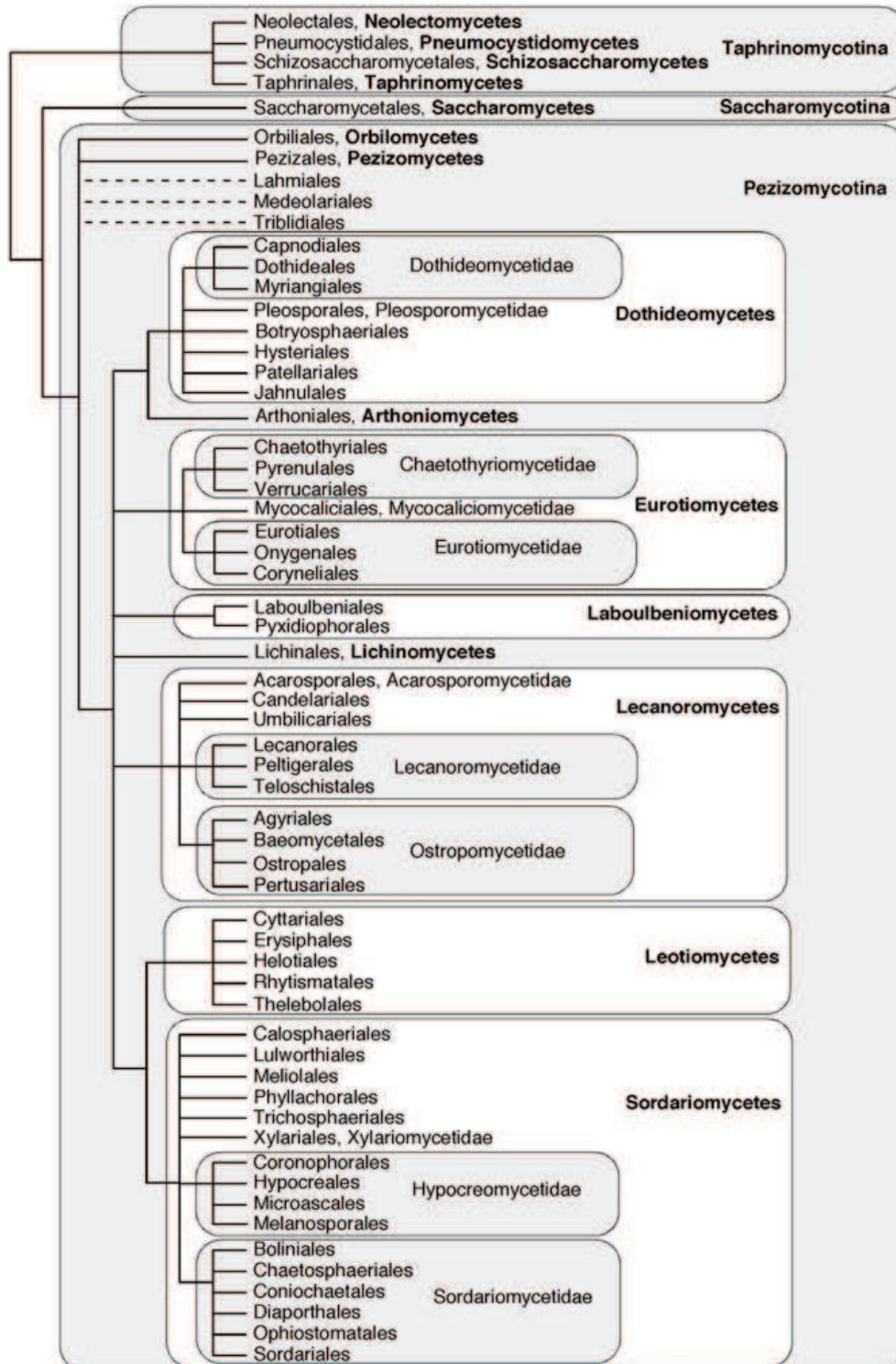


Figure 3 : Classification phylogénétique des Ascomycètes [8].

b) Basidiomycètes ou *Basidiomycota*

Les Basidiomycètes présentent une reproduction sexuée grâce aux basidiospores formées à l'extrémité de cellules fertiles, les basides. La baside est une cellule généralement clivée pourvue de stérigmates au bout desquelles sont portées les spores qui sont dispersées par le vent à maturité. Ce sont des saprophytes de végétaux (Figure 4).

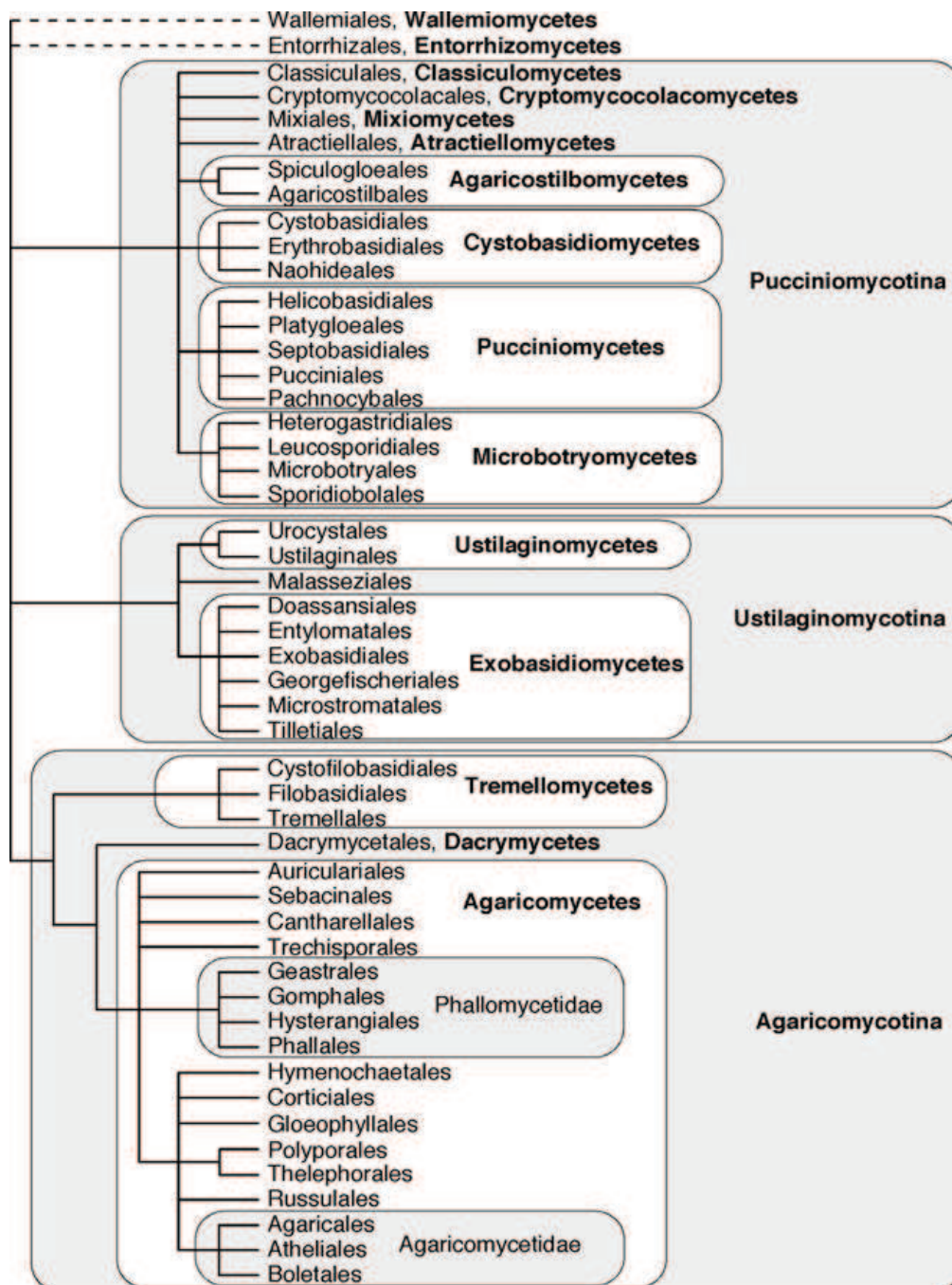


Figure 4 : Classification phylogénétique des Basidiomycètes [8].

c) Zygomycètes ou *Zygomycota*

Les Zygomycètes présentent une reproduction sexuée grâce aux zygospores. Moisissures à filaments coenocytiques, c'est-à-dire non cloisonnés, ce sont des saprophytes de végétaux. Parmi elles, les Entomophtorales parasitent les nématodes et les insectes tandis que les *Mucorales* sont opportunistes : occasionnellement responsables de mucormycoses chez des patients particulièrement immunodéprimés.

Les Glomeromycètes ou *Glomeromycota* autrefois classés dans les *Zycomycota*, sont maintenant considérés comme constituant une division à part.

d) Chytridiomycètes ou *Chytridiomycota*

Champignons les plus primitifs, ce sont les ancêtres de tous les autres champignons. Leur reproduction est sexuée grâce aux zoospores mono-flagellées. Les Chytridiomycètes sont des saprophytes de végétaux aquatiques (surtout dans l'eau douce), ils parasitent les algues. Leurs hyphes sont coenocytiques et ne forment pas un véritable mycélium. Certaines espèces sont même unicellulaires.

e) Deutéromycètes ou *Deutéromycota*

Cette division a été créée en parallèle pour inclure les champignons imparfaits (*Fungi imperfecti*) pouvant, par leur structure générale (filaments cloisonnés) et certaines caractéristiques (par exemple biochimiques), être rapprochés des Ascomycètes ou des Basidiomycètes, mais qui ne sont connus que sous ce seul état asexué (dit anamorphe). Leur reproduction sexuée n'étant pas encore découverte, ayant disparu ou ayant été remplacée par des phénomènes de parasexualité, ces formes sont désignées par un taxon qui n'a pas de réelle valeur dans le système linnéen (« form-Order », « form-Family », « form-Genus »...). Certaines espèces peuvent cependant bénéficier d'une double appellation quand leurs états asexués ou imparfaits nettement individualisés (anamorphes) ont une désinence différente des états sexués ou parfaits (téléomorphes).

Les Déutérormycètes sont des saprophytes de végétaux et de nombreuses espèces sont pathogènes et opportunistes. Elles sont connues sous le nom de « Moisissures d'intérêt médical » causant nuisances, allergies et mycoses.

3. Rôle écologique

Les champignons jouent un rôle central dans beaucoup d'écosystèmes, notamment en tant que symbiotes des végétaux, mais surtout en tant que décomposeurs bouclant le cycle du carbone et de nombreux éléments. Dans la nature, 90% des plantes vertes ont recours aux mycorhizes, qui est une association symbiotique entre les racines d'une plante et le mycélium d'un champignon. Les racines de la plante approvisionnent le champignon en glucides, produits de la photosynthèse. Le mycélium procure en retour de l'eau et des sels minéraux inaccessibles aux racines de la plante [9]. De plus avec les bactéries, les champignons « saprophytes » sont les décomposeurs qui participent le plus à la dégradation de la matière organique (feuilles mortes, débris végétaux ou animaux, excréments) et à la production d'humus dans les écosystèmes terrestres. En remettant à la disposition des autres organismes des éléments minéraux essentiels de nouveau assimilables tels que l'azote, le phosphore et le carbone, ils jouent un rôle primordial dans les cycles biogéochimiques et les chaînes alimentaires. Le mycélium fongique peut atteindre dans le sol des forêts une biomasse de 12 tonnes par hectare, constituant alors un feutrage blanc très dense d'Ascomycètes et de Zygomycètes [10].

Les champignons jouent un rôle économique considérable dans nos sociétés, pas tellement en tant qu'aliment (rare dans l'alimentation de base), mais par les maladies des plantes, dite maladies cryptogamiques, qu'ils occasionnent (85%, surtout causées par les Ascomycètes) [11]. Par ailleurs les champignons, en produisant des mycotoxines, altèrent gravement les aliments et ils ont été à l'origine de graves intoxications qui ont marqué l'histoire de l'humanité. De plus, ils servent également dans l'élaboration des nombreux aliments (pain, vin, bière, fromage...).

Récemment découvert, les champignons jouent également un rôle important au niveau du mycobiome, composante fongique du microbiome. Dans l'organisme humain, le mycobiome oral, des voies respiratoires, cutané, intestinal et génital contient des centaines d'espèces de champignons, la plupart commensaux mais certains pouvant devenir pathogènes, tel *Candida albicans*, principal responsable de la candidose [12].

4. Pathogénicité humaine

Au cours des vingt dernières années, l'incidence des infections fongiques, tant superficielles que profondes, a augmenté de façon considérable, survenant le plus souvent chez des patients fragilisés (transplantations d'organes, greffes de moelle, chimiothérapies aplasiantes, nouveaux immunosuppresseurs, ...). Si les maladies et les traitements ont évolué, les champignons impliqués dans les pathologies se sont, eux aussi, diversifiés avec l'émergence d'espèces auparavant inconnues du milieu médical, ainsi que la réémergence d'espèces au pouvoir pathogène établi, mais qui sont responsables de nouvelles formes cliniques, survenant sur des terrains différents. Ces infections sont associées à des taux de mortalité élevés, souvent liés à un retard au diagnostic. Cependant, l'arrivée de nouveaux outils moléculaires permet d'identifier avec précision les différentes souches isolées allongeant la liste des « nouveaux champignons » isolés en pathologie humaine chaque jour [13].

Mais les infections fongiques émergent aussi chez les sujets immunocompétents. Ainsi, la prévalence des mycoses à champignons « exotiques » augmente en zone d'endémie. Par ailleurs, de nombreux champignons filamenteux sont responsables de colonisation chronique des voies respiratoires chez les patients atteints d'affections respiratoires chroniques comme la mucoviscidose. Les onychomycoses sont également plus fréquentes dans la population générale, et on rapporte un nombre croissant de mycoses cutanées chez les sportifs. Le meilleur suivi des patients et la généralisation des dépistages systématiques contribuent certainement en grande partie à cette émergence. [13]

Les espèces rencontrées sont essentiellement des Ascomycètes ou des formes asexuées (Deutéromycètes) apparentées à ces derniers, plus rarement des Zygomycètes (*Mucorales*) et des Basidiomycètes [13]. Même si en principe, tous les champignons possédant un équipement enzymatique approprié peuvent trouver, sur ou dans l'organisme humain, les conditions favorables à leur développement opportuniste. De même, une altération des défenses locales (microtraumatisme, macération, traitement corticoïde, ...) autorise le développement d'une mycose superficielle. L'atteinte des défenses générales peut permettre l'envahissement dermique après franchissement de la membrane basale, éventuellement la dissémination viscérale. Toutefois, cette généralisation n'est possible que si le Champignon opportuniste tolère la température de 37° C.

B. Mycobiome

Le mycobiote se réfère à la composante fongique du microbiote vivant au sein d'un environnement donné, provenant de la contraction des termes « mycologie » et « microbiote ». Le terme « mycobiome » est utilisé à la place de mycobiote lorsque son étude se fait par le biais du contenu génique, ce qui est le cas dans la plupart des études récentes.

1. Définition

Depuis les premières études sur les champignons microscopiques datant de plus de 150 années [14], le terme mycobiote est utilisé dans le domaine de l'environnement pour désigner l'ensemble des éléments fongiques résidents dans un écosystème donné. C'est seulement au cours des trois dernières décennies que le terme mycobiote a retenu l'attention des microbiologistes, faisant son apparition, au cours des années 2000, dans le domaine médical. Le mycobiote humain est donc une entité comprenant tous les champignons, filamenteux ou levure, dispersés dans les différentes parties du corps humain. Ce mycobiote fait donc partie intégrante du microbiote humain qui comprend l'ensemble des communautés microbiennes (bactéries, archéobactéries, protozoaires, champignons et virus) qui colonisent les différents écosystèmes de l'homme [15].

Il n'existe aucune estimation précise de la charge fongique réelle dans l'organisme. Le nombre de cellules fongiques est bien inférieur à celui des cellules procaryotes, dont la masse principale, située dans le tractus digestif, est estimée à 10^{14} cellules. De ce fait, le mycobiote appartient à la part la moins abondante (inférieure à 0,1%), biosphère rare du microbiote humain [16].

La caractérisation de la composition du microbiote humain a été profondément transformée au cours des dernières années grâce à l'étude de son contenu génique, appelé microbiome, correspondant à l'ensemble des génomes des microorganismes colonisant les écosystèmes de l'homme. La composante fongique de ce microbiome se nomme donc « mycobiome ».

2. Outils d'étude

Les limites de la culture (espèces non cultivables [17], manque de sensibilité [18,19,20], problèmes d'identification) ont conduit au développement de différentes approches moléculaires, indépendantes de la culture. Le séquençage direct des gènes fongiques sans culture préalable, s'est imposé notamment avec le développement du séquençage à haut débit, méthode la plus efficace pour étudier le microbiome.

Les deux projets de grande envergure, le « Human microbiome project » aux États-Unis et le « Metagenomics of human intestinal tract (MetaHit) » en Europe [21, 22, 18] ayant défini ce qui constitue le microbiome bactérien normal des différents écosystèmes de l'homme : cavité orale, peau, vagin, voies respiratoires et tractus digestif, n'ont malheureusement pas pris en compte les champignons. Depuis 2010, le terme « mycobiome » est utilisé pour se référer au microbiome fongique mais la littérature sur ce mycobiome reste rare [23].

Par ailleurs, l'évaluation des couples d'amorces les plus intéressants à utiliser dans le cadre de l'étude du mycobiome reste à faire, sur le modèle de celle faite pour les jeux d'amorces 16S pour les études sur le microbiome bactérien [24, 25]. Différentes stratégies peuvent être utilisées selon l'objectif de l'étude : le même jeu d'amorces sera utilisé pour chaque mycobiome en cas de mesure de l'abondance relative des champignons tandis qu'une combinaison de différentes régions ciblées de l'ADNr (ADN ribosomique) sera mieux adaptée si l'on souhaite caractériser au mieux la diversité fongique. En effet, certains couples améliorent l'amplification des Basidiomycètes, tandis que d'autres favorisent les Ascomycètes [26]. Développés récemment, des pipelines spécifiques pour les études portant sur le mycobiome, comme « CloVR-ITS » et « BROCC » [27, 28], permettent l'analyse bio-informatique des résultats de séquençage à haut débit, jusqu'à l'affiliation des séquences « propres » à une unité taxonomique opérationnelle (OTU), la phylogénie ou la détermination de la diversité fongique intra et inter-groupes (appelées diversités α et β) [29, 30]. Les bases de données de séquences fongiques de référence sont encore incomparablement moins riches que celles référençant l'ADNr 16S pour les séquences bactériennes et présentent aussi des limites, notamment pour l'analyse taxonomique [27].

En dépit de ces avancées, il faut encore améliorer la fiabilité des analyses taxonomiques fongiques et poursuivre l'évaluation des bases de données disponibles afin de déterminer si les mycobiomes analysés à ce jour ont été bien caractérisés.

3. Composition du mycobiome [31]

Alors que la plupart des études basées sur la culture mettaient en évidence un pourcentage important d'individus non colonisés au niveau des principaux sites de colonisation fongique (muqueuse orale, peau, tractus digestif ou génital), les études du mycobiome grâce aux techniques de séquençage à haut débit et au développement des analyses métagénomiques font évoluer nos connaissances concernant la composition du mycobiome humain. En outre, des organes, tel que le poumon, que l'on croyait stérile, sont maintenant connus pour héberger une variété importante de champignons [20].

L'étude du mycobiome nous amène également à revoir à la hausse la prévalence de portage de certaines espèces fongiques. Drell *et al.*, par exemple, détectent de l'ADN de *Candida albicans* dans la flore vaginale de 67 % des femmes [32], alors que les études antérieures rapportent des taux de colonisation variant de 10 % à 30 % [33, 34]. Par ailleurs, la diversité fongique détectée par analyse métagénomique est bien supérieure à celle décrite en culture [23, 20, 27, 35, 36, 37, 38, 39]. De plus, les profils de distribution des espèces fongiques varient d'un site à l'autre avec cependant pour les sites les plus proches, des profils généralement similaires [40].

Le tableau 1 présente une analyse des différents mycobiomes étudiés dans la littérature.

Sites de prélèvements (nombre de sujets)	Statut clinique	Région amplifiée (ADN)	Couple d'amorces utilisées	Séquençage à haut débit	Composition du mycobiome (fréquence des taxons fongiques principaux isolés chez les sujets étudiés)	Auteurs
Mycobiome oral						
Rinçages oropharyngés (n = 20)	Sujets sains	ITS1	ITS1F/ITS2	Pyroséquençage	14 taxons présents chez plus de 20 % (4/20) des sujets étudiés avec une abondance relative individuelle > 1 % : <i>Candida</i> (75 %), <i>Cladosporium</i> (65 %), <i>Saccharomycetales</i> (50 %), <i>Aureobasidium</i> (50 %), <i>Teratosphaeria</i> (45 %), <i>Dothioraceae</i> (45 %), <i>Alternaria</i> (40 %), <i>Aspergillus</i> (35 %), <i>Saccharomyces</i> (30 %), <i>Fusarium</i> (30 %), <i>Glomus</i> (25 %), <i>Eurotium</i> (25 %), <i>Gibberella</i> (20 %), <i>Cryptococcus</i> (20 %)	Channoum 2010
Rinçages oropharyngés (n = 24)	VIH (n = 12) / Sujets sains (n = 12)	ITS1	ITS1F/ITS2	Pyroséquençage	11 taxons présents chez plus de 3/24 12 % des sujets étudiés avec une abondance relative individuelle > 1 % : <i>Candida</i> (75 %), <i>Penicillium</i> (25 %), <i>Fusarium</i> (25 %), <i>Epilobium</i> (25 %), <i>Trichosporon</i> (16,7 %), <i>Alternaria</i> (17 %), <i>Rhodotorula</i> (12 %), <i>Pichia</i> (12 %), <i>Gibberella</i> (12 %), <i>Cladosporium</i> (12 %), <i>Aspergillus</i> (12 %)	Mukherjee 2014
Salive (n = 6)	Sujets sains	ITS1	ITS1F/ITS2	Pyroséquençage	6 taxons présents chez plus de 33 % (2/6) des sujets étudiés avec une abondance relative individuelle > 1 % : <i>Malassezia</i> (100 %), <i>Epilobium</i> (66 %), <i>Cladosporium</i> (50 %), <i>Candida</i> (33 %), <i>Alternaria</i> (33 %), <i>Fusarium</i> (33 %)	Dupuy 2014
Mycobiome des voies respiratoires						
Rinçages oropharyngés/LBA (n = 27)	Transplantés pulmonaires (n = 21) / Sujets sains (n = 6)	ITS1	ITS1F/ITS2	Pyroséquençage	8 taxons présents chez plus de 19 % (4/21) transplantés pulmonaires avec une abondance relative individuelle > 1 % : <i>Candida albicans</i> (57 %), <i>Cladosporium</i> (33 %), <i>Penicillium</i> (24 %), <i>Aspergillus</i> (24 %), <i>Fusarium</i> (24 %), <i>Eurotium</i> (24 %), <i>Sclerotinia</i> (19 %), <i>Davidiellaceae</i> (19 %)	Charlson 2012
Crachats (n = 4)	Patients atteints de mucoviscidose	ITS2	3271-ITS2F/ITS2R	Pyroséquençage	8 taxons présents chez > 2 (4/4) patients avec une abondance individuelle > 1 % : <i>Candida</i> , <i>Aspergillus</i> <i>Niessentorpa</i> , <i>Malassezia</i> , <i>Trichocomaceae</i> , <i>Leotiomycetes</i> , <i>Saccharomycetales</i> , <i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Agaricomycetes</i>	Delhaes 2012
Mycobiome cutané						
Cuir chevelu (n = 7)	Sujets sains (n = 5) / Sujets avec des pellicules (n = 2)	28S	NL1/NL4	Pyroséquençage	2 genres présents chez les > 3 (5) sujets sains avec une abondance individuelle > 1 % : <i>Acremonium</i> , <i>Didymella</i> 2 genres fongiques présents chez 2/2 sujets avec des pellicules avec une abondance individuelle > 1 % : <i>Filobasidium</i> , <i>Penicillium</i>	Park 2012
14 sites cutanés (n = 10)	Sujets sains	ITS1	18SF/5.8S-1R	Pyroséquençage	1 genre très fortement prédominant sur 11 sites cutanés répartis entre la tête, le dos, les bras et le pli inguinal chez 100 % des sujets : <i>Malassezia</i> 6 genres présents chez > 3 (10) individus avec une abondance relative individuelle > 1 % : <i>Malassezia</i> , <i>Epilobium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Candida</i> , <i>Cryptococcus</i> , <i>Rhodotorula</i>	Findley 2013
Mycobiome intestinal						
Selles (n = 8)	Sujets sains	18S et ITS1	18S_0067a_deg/NSR399-18S ITS1F/ITS2	Pyroséquençage	4 taxons présents chez > 3 (8) sujets étudiés : <i>Walleria</i> , <i>Trichocomaceae</i> , <i>Saccharomycetaceae</i> , <i>Cystoflobasidiaceae</i>	Dollive 2012
Mycobiome génital						
Prélèvements vaginaux (n = 404)	Sujets sains	ITS1	ITS1F/ITS2	Pyroséquençage	6 taxons présents chez plus de 16 % des femmes avec une abondance relative > 1 % : <i>Candida</i> (68 %), <i>Saccharomycetales</i> (74 %), <i>Davidiellaceae</i> (21 %), <i>Eurotiales</i> (21 %), <i>Pleosporales</i> (16 %), <i>Basidiomycota</i> (27 %)	Drell 2013

Tableau 1 : Principales études portant sur la caractérisation du mycobiome humain et utilisant des techniques de séquençage à haut débit [31].

De toute évidence, cette caractérisation du mycobiome humain en est encore à ses débuts, avec des compartiments humains non explorés encore tel que l'estomac.

4. Rôle du mycobiome et interactions avec son environnement

Actuellement la découverte du rôle que jouent les populations fongiques au sein du microbiome humain est un des enjeux majeurs des études portant sur le mycobiome : quelles sont les interactions que les mycobiotomes peuvent entretenir entre eux, avec le microbiome bactérien ou leur hôte mais aussi leur implication potentielle dans la genèse ou l'évolution de pathologies spécifiques.

a) Interactions entre les différents mycobiotomes

Des interactions potentielles entre les différentes composantes du mycobiome humain ont été découvertes. Ainsi, des liens entre le mycobiome respiratoire et le

mycobiome intestinal ont été mis en évidence par Noverr *et al.* dans un modèle murin : la multiplication de *Candida albicans* dans le microbiome intestinal après antibiothérapie modifierait le microbiome respiratoire et augmenterait le risque de développer des maladies allergiques respiratoires induites par *Aspergillus fumigatus* [41]. Ce type d'interaction pourrait être la conséquence d'une translocation intestinale de molécules fongiques qui initierait une réponse immunitaire systémique et faciliterait une colonisation et/ou une infection à distance [42].

b) Interaction entre le mycobiome et le microbiome bactérien

Des interactions entre le mycobiome et certaines bactéries du microbiome ont également été décrites, et pourraient jouer un rôle dans certaines pathologies. Ainsi, certains microorganismes bactériens et fongiques peuvent avoir un effet synergique les uns sur les autres. Cela a été rapporté pour *Mycobacterium* et *Aspergillus* dans le tractus respiratoire, leur commensalisme concomitant pourrait renforcer de façon synergique leur résistance respective à la pression de l'environnement, notamment aux agents antimicrobiens [43]. Par ailleurs, une étude sur les gerbilles de Mongolie montre que la levure *Kazachstania heterogenica* colonise l'estomac exactement dans les mêmes régions que la bactérie *Helicobacter suis* et peut conduire à une potentialisation de l'inflammation causée par *Helicobacter* dans ce modèle animal. En effet, la co-infection expérimentale de la gerbille avec *K. heterogenica* et *H. suis* a montré une augmentation significative de l'inflammation gastrique chez ces animaux infectés par les deux micro-organismes par rapport aux animaux infectés seulement par *H. suis* [44].

Dans d'autres cas, il s'agit plutôt d'une « concurrence » entre bactéries et champignons, comme par exemple pour *Pseudomonas aeruginosa*, dont la présence inhibe la croissance fongique de *Candida albicans* chez les patients atteints de mucoviscidose [45].

c) Interactions entre l'hôte et son mycobiome

Les interactions entre l'hôte et son microbiome, dont fait partie le mycobiome, sont soigneusement équilibrées. Plusieurs facteurs liés à l'hôte (facteurs génétiques, environnement, mode de vie, alimentation) ont un effet sur la composition et les variations du mycobiome [46]. La confirmation de l'importance du mode de vie et de l'alimentation dans la composition du microbiome intestinal humain a été récemment apportée par la découverte d'un profil de colonisation intestinal à levures inattendu dans une communauté traditionnelle amérindienne, vivant isolée en milieu naturel. Alors que *Candida albicans* est, de loin, l'espèce de levure prédominante dans le microbiome intestinal des individus sains vivants dans les pays industrialisés (plus de 80 % des sujets sains colonisés par des levures au niveau du tractus digestif sont porteurs de *C. albicans*), moins de 7 % des sujets colonisés par des levures dans cette communauté étaient porteurs de *C. albicans* [47]. Par ailleurs, certains des facteurs influençant le mycobiome pouvant évoluer au cours du temps, la composition de ce dernier peut varier. Nagata *et al.* ont, par exemple, montré en utilisant comme indicateur le génotypage des espèces de *Malassezia*, que la flore cutanée mettait 30 jours à passer de l'état post-natal à l'état d'adulte [48].

d) Associations entre mycobiome et pathologies

À ce jour, plusieurs associations entre mycobiome et pathologies ont été rapportées dans la littérature mais elles demandent encore à être validées.

Par exemple, plusieurs études ont caractérisé le mycobiome respiratoire de patients atteints de mucoviscidose [49, 50, 20] et ont observé une diversité fongique moins riche chez les patients atteints que chez les individus sains, en particulier lorsque la fonction respiratoire est très altérée. Un phénomène similaire pourrait également être observé au sein du mycobiome des patients atteints de bronchopneumopathie chronique obstructive (BPCO) ou d'asthme sévère [17]. Il a également été montré que le mycobiome intestinal joue un rôle dans le déclenchement de la maladie du greffon contre l'hôte. En effet, les sujets colonisés par *Candida albicans* présentent un risque accru de développer une maladie du greffon contre l'hôte de grade élevé si on les compare aux sujets non

colonisés. Ceci permet d'envisager un nouvel axe thérapeutique, de type anti infectieux, dans cette pathologie [51].

Par ailleurs, le mycobiome et le microbiome bactérien ont aussi le potentiel de moduler la réponse immunitaire de l'hôte aux différents pathogènes. Certains champignons commensaux, comme *Malassezia* spp. ou *Candida albicans*, qui co-évoluent généralement avec l'homme, sont, par exemple, des acteurs importants dans la modulation du système immunitaire adaptatif de l'hôte [52]. D'autres champignons peuvent même jouer un rôle d'agent préventif et thérapeutique dans certaines pathologies, comme, par exemple, *Saccharomyces boulardii* dans les maladies diarrhéiques [53].

Toutefois, les relations « amicales » qu'entretiennent les champignons commensaux avec leur hôte peuvent parfois se rompre et se transformer en relation de pathogènes opportunistes. Si la pathogénicité de nombreuses espèces de champignons est bien étudiée, la corrélation entre la diversité du mycobiome et son impact sur la progression de certaines maladies est moins clairement définie. Dans certaines pathologies, comme les MICI [54, 55], la dermatite atopique [56] ou l'hépatite B au stade chronique ou au stade de la cirrhose, la diversité des champignons présents est proportionnelle à la progression de la maladie [19]. Dans d'autres contextes, comme la mucoviscidose [50, 29] ou chez les patients allergiques [57], la diversité fongique est inversement proportionnelle à la progression de la maladie [57].

Il est donc difficile, actuellement, de faire une conclusion généralisée sur le rôle du mycobiome, et en particulier de sa diversité, en santé humaine. De façon générale, il existe une corrélation positive entre diversité fongique et maladies infectieuses, les champignons pouvant être des pathogènes directement responsables d'infections ou de facteurs aggravant d'une infection préexistante. En revanche, dans les maladies chroniques, où l'infection fongique joue un rôle secondaire, on semble observer plutôt une corrélation inversée entre diversité fongique et progression de la maladie, du fait, probablement, de l'altération du microenvironnement qui devient moins favorable à la croissance des champignons. Pour finir, il reste à établir si les variations du mycobiome associées à ces pathologies en sont la cause ou la conséquence [58]. Si la majorité des

espèces fongiques qui composent le mycobiome humain joue un rôle commensal voire bénéfique pour leur hôte, certains profils de mycobiome apparaissent désormais impliqués comme « cofacteurs » potentiels dans la physiopathologie de plusieurs maladies. À terme, la compréhension fine de la pathogénicité des champignons combinée à l'étude approfondie du microbiome devrait permettre d'élargir nos connaissances concernant l'environnement microbien dans différents contextes pathologiques, de mieux comprendre la pathogenèse de certaines affections et de proposer de nouvelles voies thérapeutiques.

5. Perspectives thérapeutiques

Envisager des thérapeutiques qui modifieraient ou moduleraient le mycobiome afin d'améliorer la prise en charge de certaines pathologies est une voie d'avenir à plus ou moins long terme. [51]. Dans les faits, cette approche est déjà utilisée avec les thérapies probiotiques qui visent à stimuler de manière sélective la croissance des bactéries commensales du tube digestif, entraînant ainsi la restauration de l'intégrité d'un microbiome « protecteur » de la muqueuse intestinale [54].

Par ailleurs, avec l'approfondissement des connaissances concernant les mécanismes impliqués dans la modulation de la réponse immunitaire aux champignons, de nouvelles thérapeutiques immunitaires pourraient être proposées afin de traiter des maladies associées à une altération du mycobiome. Différents anticorps monoclonaux efficaces, qui favorisent l'opsonisation de cellules fongiques en vue de leur phagocytose, activent le système du complément ou agissent directement sur les cellules fongiques [59] ont déjà été mis au point pour plusieurs espèces fongiques [53]. La vaccination antifongique ciblée, combinée aux stratégies prophylactiques et thérapeutiques, est également une voie de recherche.

Toutefois, la limite des thérapeutiques immunitaires actuelles est que la plupart ne ciblent qu'une seule espèce fongique, ignorant la composition globale du mycobiome. Le développement d'un anticorps monoclonal à large spectre ou d'un vaccin universel ciblant des champignons pathogènes multiples serait donc une avancée thérapeutique majeure.

Les thérapeutiques d'avenir devront prendre en compte également le polymorphisme génétique humain, qui peut modifier le risque de développer la maladie associée à une anomalie du mycobiome [60]. De ce fait, le traitement personnalisé est une voie d'avenir. Les patients pourraient ainsi être stratifiés en fonction de leur risque individuel face à la maladie fongique mais également en fonction de leur capacité à répondre aux antifongiques, ce qui permettrait d'optimiser l'effet thérapeutique et de réduire les risques de résistance antifongique [58].

C. Identification moléculaire des champignons

1. Méthodes classiques d'identification fongique

Les premières cultures fongiques datent des années 1920 et bien que les techniques de culture se soient améliorées depuis, les champignons ne sont toujours pas cultivés de manière optimale : soit parce qu'ils sont en faible abondance, soit parce qu'ils ont besoin d'interactions avec d'autres micro-organismes pour se développer [17]. Ainsi sur 64 biopsies qui montraient des éléments fongiques à l'examen microscopique, Rossetti et al. [61] n'ont obtenu une culture positive que pour 34 (52 %) d'entre-elles. Les études de microbiote se retrouvent face à la même problématique avec plus de 60 % des espèces ou genres non détectés par culture dans une étude sur le microbiome bactérien et fongique de patients atteints de mucoviscidose [20], une autre étude portant sur le mycobiome de la cavité orale chez des sujets sains retrouvait en culture seulement 11 des 85 genres fongiques identifiés [18]. Enfin, une étude portant sur le mycobiome du tractus gastro-intestinal a identifié 37 groupes fongiques différents contre seulement 5 espèces isolées en culture [19].

L'enjeu est important car les infections fongiques profondes sont une cause importante de morbidité et de mortalité chez les patients immunodéprimés et de nombreuses espèces peuvent en être responsables [62,63]. L'émergence d'infections dues à des espèces de levures autres que *Candida albicans* ou dues à des champignons filamenteux autres qu'*Aspergillus sp* [64,65] impose une identification précise de l'agent responsable de l'infection pour adapter au mieux le traitement antifongique des patients. Ce diagnostic microbiologique des infections fongiques profondes est rendu difficile par le délai et la faible sensibilité des techniques d'isolement en culture des champignons à partir des biopsies de tissus infectés et des hémocultures. Par ailleurs, l'examen histologique quand il est positif permet rarement à lui seul d'identifier avec certitude l'espèce responsable du processus infectieux [66]. En ce qui concerne l'étude de microbiote, comme pour les bactéries non cultivables dans le microbiote bactérien, la majeure partie du mycobiome humain est constituée de champignons non cultivables [31].

Les limites de la culture ont conduit au développement, au cours des vingt dernières années, de différentes approches moléculaires, indépendantes de la culture, comme l'approche RFLP (restriction fragment length polymorphism), OFRG (oligonucleotide finger printing of rRNA genes), DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis) ou encore l'hybridation in situ [31]. Ces techniques sont utiles pour comparer la diversité fongique entre différents groupes, mais n'ont pas la spécificité nécessaire pour identifier les espèces de champignons contenues dans un écosystème ou responsables d'infections fongiques profondes. Le séquençage direct des gènes fongiques se place comme la méthode la plus efficace pour ces identifications, capable d'identifier les champignons présents dans les liquides biologiques ou les tissus infectés sans culture préalable. Il représente une bonne alternative pour pallier au manque de spécificité et de sensibilité des techniques histologiques ou culturelles habituellement utilisées.

2. Rappel sur les techniques de biologie moléculaire

a) Extraction de l'ADN

L'extraction d'acides nucléiques d'un matériau biologique comporte plusieurs étapes dont la lyse cellulaire, étape cruciale qui conditionne l'efficacité de l'extraction. Elle doit être adaptée à ce qui doit être lysé (cellules ou tissu ; bactérie, virus, champignon ou parasite) et à l'acide nucléique à purifier. Les différentes méthodes de lyse cellulaire utilisées sont la rupture mécanique (broyage, lyse hypotonique, congélation/décongélation, boiling (incubation dans l'eau bouillante), ultrasons), le traitement chimique (lyse détergente, agents chaotropiques, agents réducteurs) ou la digestion enzymatique. Pour cette dernière, on utilise de la protéinase K mais on peut aussi avoir recours à d'autres enzymes additionnelles pour la lyse de certaines cellules ou tissus : lysozyme, N-acétylmuramidase, $\beta(1-3)$ glucanase et lysostaphine qui ciblent la paroi des bactéries, lyticase pour les levures et chitinase pour les champignons.

Les autres étapes sont la dénaturation des protéines, l'inactivation des nucléases cellulaires puis la séparation de l'acide nucléique des autres composants

cellulaires par utilisation de billes magnétiques dans l'extraction automatisée ou de colonnes ayant une membrane de silice (Qiagen).

b) Polymerase Chain Reaction (PCR)

La PCR (polymerase chain reaction) est une technique de biologie moléculaire qui permet l'amplification spécifique d'une séquence nucléotidique *in vitro*. Le principe de la PCR consiste en une série d'une trentaine de cycles (27 à 35) eux-mêmes constitués de trois étapes : une dénaturation à 94°C, une hybridation à 58°C et une polymérisation à 72°C (Figure 5).

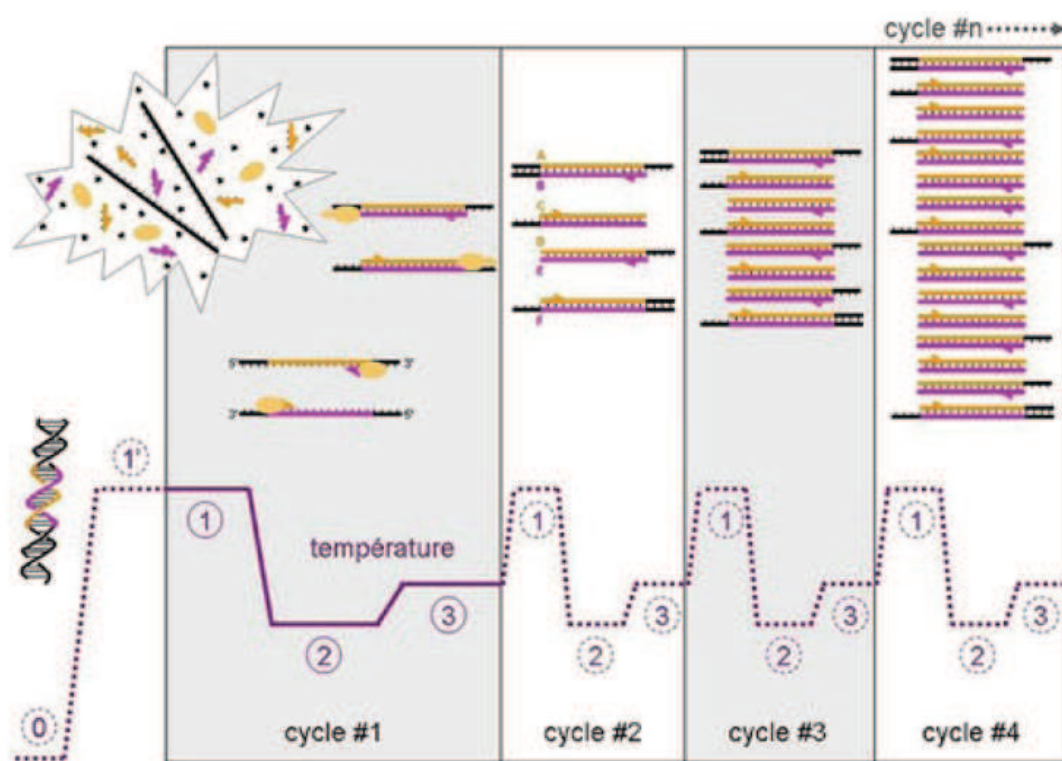


Figure 5 : Principe de la technique de PCR.

Le contrôle de la PCR se fait grâce à l'utilisation de témoins positifs (matrice d'ADN connue) et négatifs (eau pure) intégrés à chaque série d'amplification. La technique d'électrophorèse en gel d'agarose permet de visualiser la présence, la taille et la pureté des fragments d'ADN amplifiés. Elle est basée sur la séparation des acides nucléiques chargés négativement sous l'effet d'un champ électrique. La taille des fragments d'ADN amplifiés est déterminée grâce à un marqueur de poids

moléculaire déposé en parallèle des échantillons. Dans le cas des champignons, il existe une très grande variabilité de taille de séquence en fonction des genres et même des espèces. Cependant, cette variation de taille ne suffit pas à les différencier par amplification et le séquençage est toujours nécessaire pour l'identification fongique. Pour exemple, la taille de la séquence amplifiée par le couple d'amorce ITS1/ITS4 varie de 382 paires de base (pb) pour *Candida lusitaniae* à 881 pb pour *Candida glabrata*.

c) Séquençage

Le séquençage de l'ADN consiste à déterminer l'ordre d'enchaînement des nucléotides d'un fragment d'ADN donné (de quelques centaines de bases). Les technologies de séquençage ont été créées au milieu des années 1970 et ont été continuellement améliorées depuis.

- **Méthode de Sanger**

La méthode de séquençage de l'ADN développée par Frederick Sanger au milieu des années 1970 a été la plus répandue pendant près d'une vingtaine d'année et lui a valu son deuxième prix Nobel en 1980 [67]. Elle concurrençait au départ celle de Maxam et Gilbert créée en 1977 [68]. Cette dernière a été rapidement abandonnée car elle s'appuyait sur des produits toxiques et sur la mesure de radioactivité.

La technique de Sanger repose sur l'utilisation de 2'-3'didésoxyribonucléotides (ddNTPs), aussi appelés « terminateur de chaîne » marqués par des fluorochromes. Ils diffèrent des désoxyribonucléotides (dNTPs) par l'absence d'un groupe hydroxyle (-OH), empêchant la poursuite de l'élongation (Figure 6).

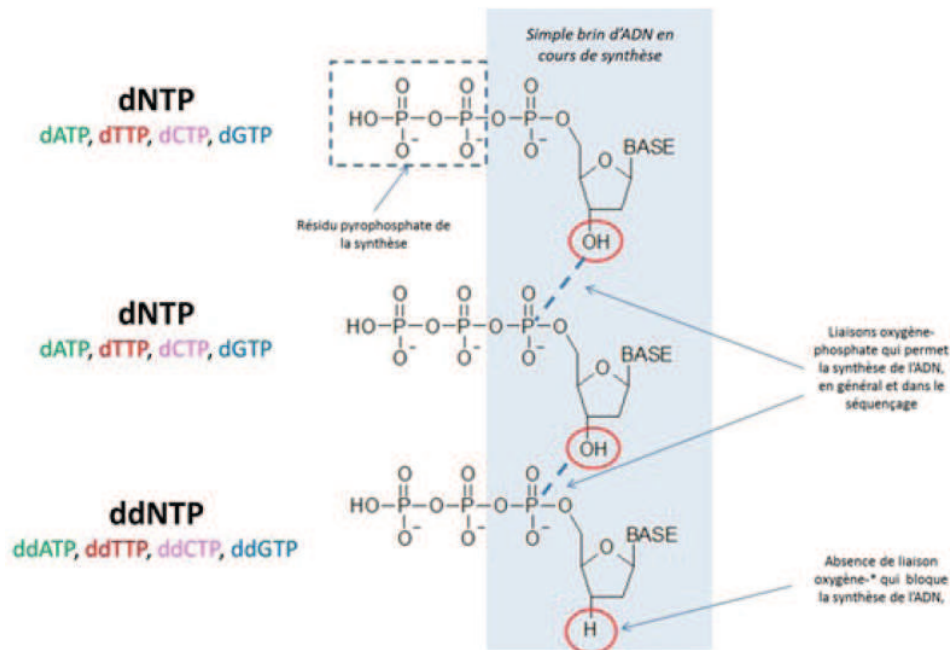


Figure 6 : Spécificité des ddNTPs « terminateurs de chaîne ».

L'incorporation aléatoire de ces ddNTPs se fait statistiquement à chaque position de nucléotide dans le fragment d'ADN et permet d'en déduire la séquence nucléotidique par détection de la fluorescence. Dans les séquenceurs automatiques de seconde génération, aujourd'hui utilisés par la plupart des laboratoires, cela se fait par électrophorèse capillaire (Figure 7).

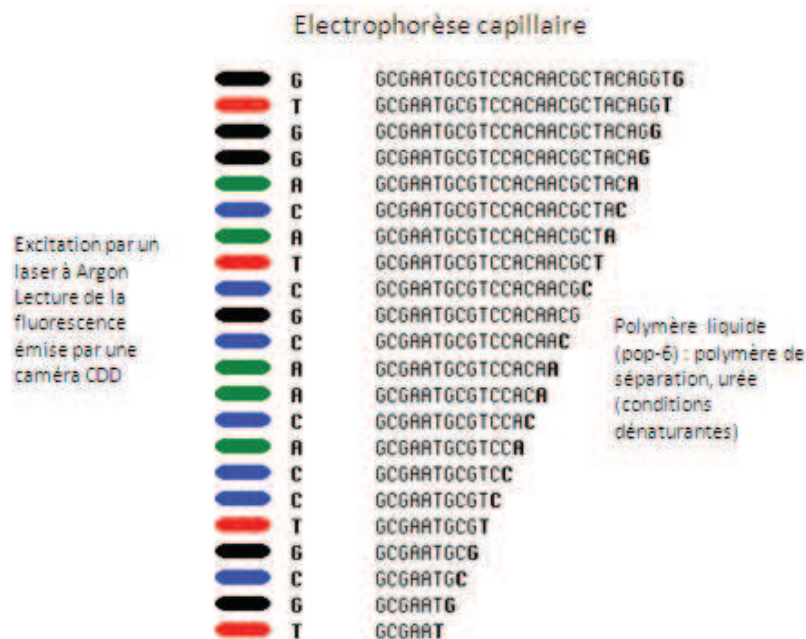


Figure 7 : Détermination de la séquence nucléotidique par électrophorèse capillaire.

Le résultat est présenté par la machine sous forme de courbes appelées électrophorégrammes. Ils présentent la fluorescence détectée en continuum de luminosité sur les quatre couleurs analysées et l'interprétation qui en est faite en terme de nucléotides : un « pic » correspond à la détection d'un nucléotide donné dans la séquence (Figure 8). Classiquement, les couleurs utilisées sont le vert pour l'adénine, le rouge pour la thymine, le bleu pour la cytosine et le noir ou jaune pour la guanine.

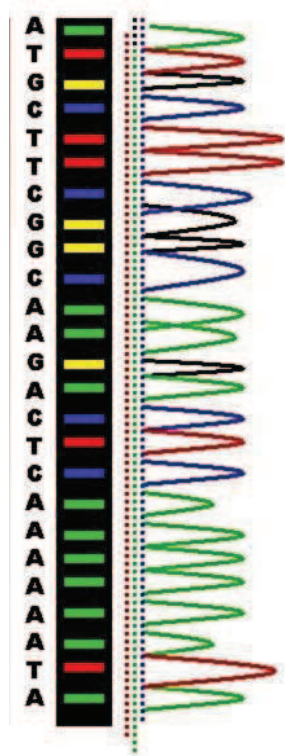


Figure 8 : Electrophorégramme et séquence nucléotidique correspondante.

Ces dix dernières années, sont apparues d'autres méthodes et technologies de séquençage, dans un rythme d'innovation qui s'est sans cesse accéléré, ce sont les séquençages à haut débit, beaucoup plus rentables que la méthode classique de séquençage Sanger. Au lieu de bloquer la synthèse aléatoirement à la hauteur de n'importe quelle base comme dans la méthode de Sanger, un grand nombre de nouvelles méthodes vont gérer la synthèse base par base de manière contrôlée et analyser le résultat au fur et à mesure, d'où l'appellation "temps réel".

- **Pyroséquençage (Roche/454, Qiagen)**

Le pyroséquençage utilise une méthode de séquençage créée en 1988 par Hyman [69] et perfectionnée ensuite entre 1996 et 1998 par l'intégration de la PCR dans le processus. La polymérisation se fait base par base en alimentant successivement le mix de séquençage avec les quatre dNTPs (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) puis on détecte le dNTP qui s'est incorporé au cours de cette polymérisation. La détection utilise le résidu de polymérisation : le pyrophosphate (PPi, molécule à deux phosphates) qui se détache des dNTPs lorsque le reste (1 base, 1 ribose et 1 phosphate) s'intègre au brin d'ADN en cours de construction. Pour chaque base synthétisée, il y aura donc un dégagement de PPi qui sera alors converti par une triple réaction chimique en dégagement de lumière détecté avec une caméra CCD (charge coupled device). Si il y a plusieurs bases du même type en suivant dans la matrice ADN, plusieurs dNTPs du même type seront incorporés et l'émission de lumière sera multipliée d'autant. A la fin de la réaction, une apyrase dégrade les dNTPs qui n'ont pas été utilisés tout comme les résidus de réaction et le cycle peut recommencer (Figure 9).

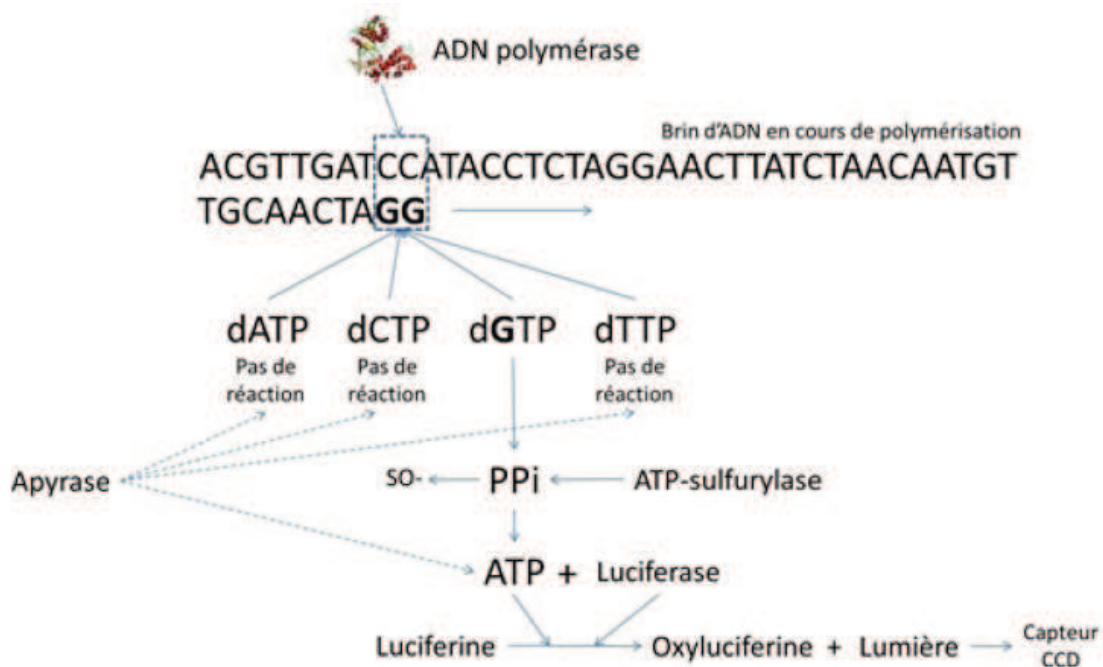


Figure 9 : Dégagement de lumière par triple réaction chimique à partir du PPi dégagé.

En dépit de son coût relativement élevé, le pyroséquençage selon la technologie 454 de Roche est la méthode la plus couramment utilisée car elle permet l'obtention des séquences nucléotidiques les plus longues (jusqu'à 500 pb).

- **Séquençage par terminateur réversible (Illumina, Helicos)**

Le séquençage par terminateur réversible CRT (Cyclic Reversible Termination) est commercialisé par Illumina sous l'appellation TruSeq dans ses machines HiSeq et MiSeq et aussi dans une autre variante chez Helicos. Cette méthode utilise des dNTPs possédant un terminateur de chaîne réversible : le nitrophényl, qui bloque momentanément la polymérisation. Chez Illumina, la détection de ce dNTP incorporé se fait grâce au marquage par fluorescence en mode quatre couleurs (une par type de base) tandis que chez Helicos, chaque dNTP est ajouté successivement avec une détection en noir et blanc. Une fois le dNTP incorporé, le nitrophényl-terminateur de chaîne est éliminé grâce aux ultra-violets et le nucléotide suivant peut être incorporé. Il s'agit donc d'un séquençage dit temps-réel (environ 2 minutes par base). La plate-forme HiSeq offre le plus grand nombre de données à moindre coût (50 fois moins cher que la technologie 454 de Roche), alors que le MiSeq est plus approprié pour générer de plus longues séquences en un temps plus court [70].

Actuellement, le principal problème lié aux techniques de séquençage à haut débit réside dans l'analyse bio-informatique du très grand nombre de séquences générées. L'analyse doit associer une série d'outils bio-informatiques, ou pipelines, permettant de réaliser de façon indépendante les différentes étapes d'analyse des données jusqu'à l'affiliation des séquences « propres » à une OTU, la phylogénie ou la détermination de la diversité fongique intra et inter-groupes [29, 30]. Des pipelines spécifiques pour les études portant sur le mycobiome, comme « CloVR-ITS » et « BROCC », ont été développés récemment [27, 28].

De nouvelles technologies totalement différentes sont également développées présentant l'avantage de ne pas avoir à répliquer l'ADN ni d'utiliser de fluorochromes. Sous la forme d'une puce dotée de nanopores, la machine capte directement les signaux électriques de chaque base d'ADN qui traversent le pore et permet de séquencer un petit génome en un temps record et pour un prix dérisoire.

d) Analyse des séquences nucléotidiques

Il existe de nombreux logiciels d'analyse tels que Chromas Pro, Sequencher, Seqscape, Bioedit, Bionumerics ou encore Biolumics qui permettent d'aligner (appariement des nucléotides homologues) et de nettoyer les séquences nucléotidiques brutes obtenues par séquençage.

Chaque produit de PCR engendre deux électrophorégrammes de séquençage correspondant aux deux réactions de séquençage réalisées à l'aide des deux amorces : sens (front) et antisens (reverse), une pour chaque brin d'ADN complémentaire. La lecture visuelle des électrophorégrammes permet de vérifier les bases qui diffèrent entre les deux séquences nucléotidiques (mismatches) ou les doubles pics (haploïdes) codifiés par un code international (Figure 10) et de les corriger. Ils peuvent avoir une importance pour le typage ou l'étude de mutation.



➤ G	=	Guanosine
➤ A	=	Adenosine
➤ T	=	Thymidine
➤ C	=	Cytidine
➤ R	=	G or A, puRine
➤ Y	=	C or T, pYrimidine
➤ K	=	G or T, Keto
➤ W	=	A or T, Weak (2 H-bonds)
➤ S	=	C or G, Strong (3 H-bonds)
➤ M	=	A or C, aMino
➤ B	=	C, G or T (i.e., not A)
➤ D	=	A, G or T (i.e., not C)
➤ H	=	A, C or T (i.e., not G)
➤ V	=	A, C or G (i.e., not T)
➤ N	=	A, C, G or T, aNy
➤ X	=	A, C, G or T

Figure 10 : Code international des nucléotides.

Après nettoyage des séquences, on réalise une séquence unique appelée « séquence consensus » à partir des deux séquences nucléotidiques brutes. Le facteur limitant de cette étape d'analyse est la lisibilité des électrophorégrammes. Les débuts et fins sont souvent inexploitable du fait de la perte de résolution et le bruit de fond peut interférer dans la lecture. L'identification précise des bases est impossible en cas d'intensité du signal insuffisant. Cela peut être dû à une quantité insuffisante d'ADN matrice ou d'amorces, des problèmes d'amorces dégradées, impures ou mal designées mais également des contaminants (inhibiteurs ou excès de sels). On peut également rencontrer des pertes de matériel génétique lors des purifications.

L'identification moléculaire se fait ensuite par comparaison de la séquence consensus obtenue avec des bases de données de séquences existantes publiques ou personnelles plus ou moins spécialisées à l'aide du programme d'alignement BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Les bases de données de séquences fongiques de référence sont encore incomparablement moins riches que celles référençant l'ADNr 16S pour les séquences bactériennes, limitant la capacité à classer les séquences d'ADNr fongique au niveau de l'espèce. Sept bases de données fongiques d'ADNr sont disponibles : Mycobank, NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA), EMBL-EBI (European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute, UK), DDJB-NIG (DNA Data Bank of Japan - National Institute of Genetics, Japon), Silva, Unité et BioloMICS [35, 71, 72, 73].

Le programme d'alignement recherche, dans une base de données de séquences, un alignement optimal à une séquence donnée grâce à un algorithme de comparaison de séquences (BLAST). Cet algorithme repose sur le principe qu'un vrai alignement contient de courts segments de concordance (presque) parfaite [74]. Les résultats de l'alignement comprennent la description, le score d'identité, le pourcentage de similitude et de recouvrement, l'expectation value et la taille de la région alignée. Beaucoup de facteurs affectent le pourcentage du score d'identité incluant la qualité et la longueur de la séquence consensus ainsi que le nombre et l'exactitude des données existantes dans la base de données pour les espèces et locus. On obtient ainsi un score d'alignement brut S , calculé comme la somme des

scores de substitution et de gaps, qui définit une concordance entre deux séquences. On en déduit le score S' dans lequel les propriétés statistiques du système de notation utilisée ont été prises en compte. Ainsi normalisé dans le respect du système de notation, il peut être utilisé pour comparer des scores d'alignement de différentes recherches [74]. La concordance entre deux séquences est aussi définie par le pourcentage de similitude. L'expectation value (E value) est le paramètre qui décrit le nombre de résultats concordants que l'on peut "s'attendre" à avoir par hasard en recherchant dans une base de données d'une taille particulière. Il décroît exponentiellement avec le score S . Essentiellement, l'E-value décrit le bruit de fond aléatoire qui existe pour les concordances entre séquences. Plus l'E value est bas, ou proche de 0, meilleur est la significativité de la concordance. Cependant, il est important de noter que les recherches avec des petites séquences ont un E value relativement haut car elles ont une haute probabilité d'apparition dans la base de données purement par hasard. C'est pourquoi le calcul de l'E-value prend également en compte la longueur de la séquence consensus [74]. Le recouvrement (Query cover) est le pourcentage de la séquence consensus qui s'aligne avec la séquence de référence, cependant il ne prend pas en compte la longueur de la séquence de référence qui peut être de taille inférieure [74].

Avant de valider une identification moléculaire, il est important de vérifier l'origine des souches dont la séquence a été déposée dans la base de données ainsi que la date du dépôt et de préférer les séquences de la souche type ou de souche de collection ATCC (American Type Culture Collection) ou CBS (Centraal Bureau voor Schimmelcultures) de dépôt récent. En effet, le dépôt de séquences sur Genbank par exemple, n'est pas contrôlé ce qui rend l'identification de la souche critique. Ces bases de données sont utiles mais elles présentent aussi des limites, notamment pour l'analyse taxonomique. En effet, la taxonomie fongique est complexe et ne cesse d'évoluer, ce qui génère la présence de nombreux synonymes taxonomiques et favorise les erreurs de classification. Ainsi, certaines formes sexuées ou asexuées d'une même espèce de champignon peuvent être affiliées à des taxons différents [27]. De plus, il faut corrélérer l'identification moléculaire avec l'identification ou la présomption phénotypique ainsi que le contexte.

3. Identification moléculaire des champignons

a) La détection par amorces pan-fongiques « universelles »

Pour la détection dite « universelle » de séquences d'ADN d'origine fongique, les amorces sont choisies pour hybrider avec des séquences conservées ou « consensus » du génome fongique qui encadrent des régions de séquences variables selon les espèces. Ces techniques de détection universelle ont été évaluées pour rechercher de l'ADN fongique à partir d'échantillons de sang [75] ou de prélèvements tissulaires : prélèvements oculaires chez des patients atteints d'endophtalmie ou de kératite [76] ou biopsies de tissus [77].

Les gènes ciblés par les techniques d'amplification « universelle » appartiennent au complexe génique nucléaire ADN_r codant pour les ARN ribosomaux (ARN_r) : 18S ou SSU (small subunit), 28S ou LSU (large subunit) et 5,8S. Ces gènes sont séparés les uns des autres par les régions ITS 1 et ITS 2 qui ne sont pas transcrites en ARN_r (Figure 11).

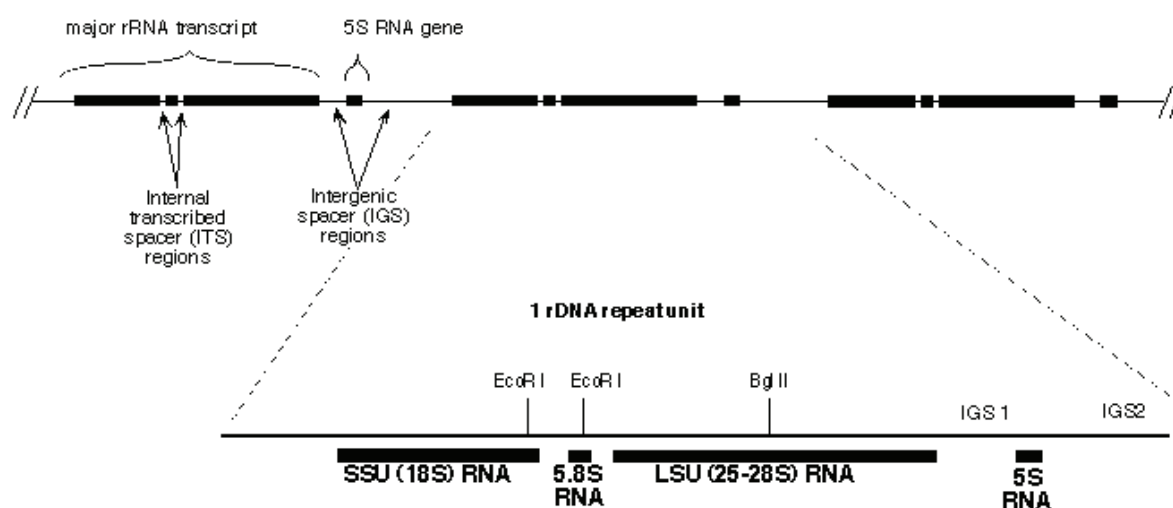


Figure 11 : Complexe génique nucléaire codant pour l'ARN_r [79].

Chez les champignons, les séquences des gènes codant pour l'ARNr sont relativement conservées parmi les espèces et sont donc moins discriminantes que les séquences des régions ITS qui ont un degré de polymorphisme plus grand [78]. Ces gènes codant pour l'ARNr dans le génome des champignons sont des gènes multicopies répétés en tête à queue. Chaque répétition code pour un transcrit majeur ARNr ponctué par une ou plusieurs régions intergéniques IGS (intergenic spacer). Chez *Saccharomyces cerevisiae* par exemple, il existe environ 140 copies de ces gènes. [78]. Chez certains champignons (principalement les Basidiomycetes et les levures Ascomycètes), chaque répétition contient également une région codante séparée pour le transcrit ARN 5s dont la position et la direction de transcription varie selon les groupes et qui se trouve au milieu de la région IGS, la partageant en deux régions plus petites IGS1 et IGS2.

La région des gènes codant pour l'ARNr est une cible de choix pour la mise au point d'une technique permettant la détection d'un large éventail d'espèces potentiellement pathogènes. Elle est en effet présente chez tous les champignons et contient des séquences conservées permettant de dessiner des amorces encadrant des séquences variables spécifiques d'espèce ou de groupe d'espèces. De plus, le nombre important de copies de ces gènes a l'avantage de conférer une grande sensibilité aux techniques d'amplification génique ciblées sur cette région.

Le laboratoire Vilgalys de l'université de Duke a compilé une liste d'amorces conservées utilisable pour l'amplification et le séquençage de l'ADNr de la plupart des groupes de champignons, aussi bien que les autres eucaryotes [79]. L'ensemble des amorces recouvre la plupart des régions codantes de l'ADNr, permettant l'amplification de n'importe quelle région désirée.

- **Internal Transcribed Spacer (ITS)**

La région ITS est peut être aujourd'hui la région de l'ADN fongique la plus largement séquencée. C'est la plus utilisée pour les études d'écologie et de taxonomie moléculaire des espèces et même à l'intérieur des espèces à cause de son plus haut degré de variation que les autres régions fongiques du gène

ribosomal (SSU et LSU) : des variations intra-individuelles des régions répétées du gène peuvent être observées à l'intérieur des régions ITS et IGS [79]. L'espaceur transcrit ITS (ITS1 et ITS2) conjointement amplifié avec le gène 5,8S, est un bon marqueur spécifique, mais il est tellement conservé qu'il est capable de s'hybrider à l'ADN humain avec des amorces non spécifiques, ce qui pose problème avec les échantillons humains. Les amorces pouvant être utilisées pour amplifier ce gène sont les amorces ITS: ITS1, ITS2, ITS3, ITS4 et ITS5 décrites par White *et al* en 1990 [80] (Figure 12). En plus des amorces standards ITS1 et ITS4 utilisées par la plupart des laboratoires, plusieurs amorces spécifiques de taxon ont été décrites ce qui permet une amplification sélective de séquence fongique : par exemple ITS1F spécifique des champignons et ITS4B spécifique des Basidiomycètes décrites par Gardes *et al.* en 1993 [81]. D'autres amorces peuvent être utilisées comme les amorces 5,8S [82] ainsi que V9D [83] et LS266 [84].

Internal transcribed spacer (ITS) region primers

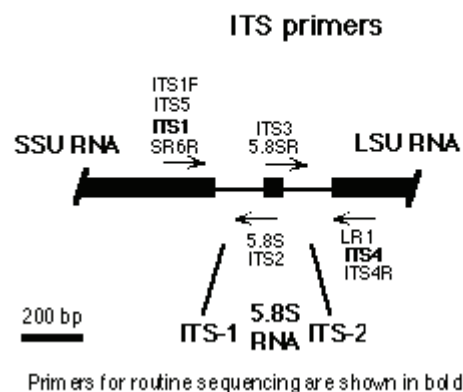


Figure 12 : Amorces encadrant les régions ITS [79].

- **Large subunit LSU (25-26-28s)**

Une grande partie du gène est très conservée même entre les différents taxons. Cependant, les 600 à 900 premières bases du gène LSU contiennent les trois domaines divergents D1, D2 et D3 parmi les régions les plus variables du complexe génique ADN_r entier, utiles pour les études de taxonomie moléculaire [79]. Les amorces pouvant être utilisées pour amplifier le gène LSU et une portion de la région IGS sont les amorces LR et 5,8s [82, 85, 86] (Figure 13).

Large subunit RNA (25-28S) primer sequences

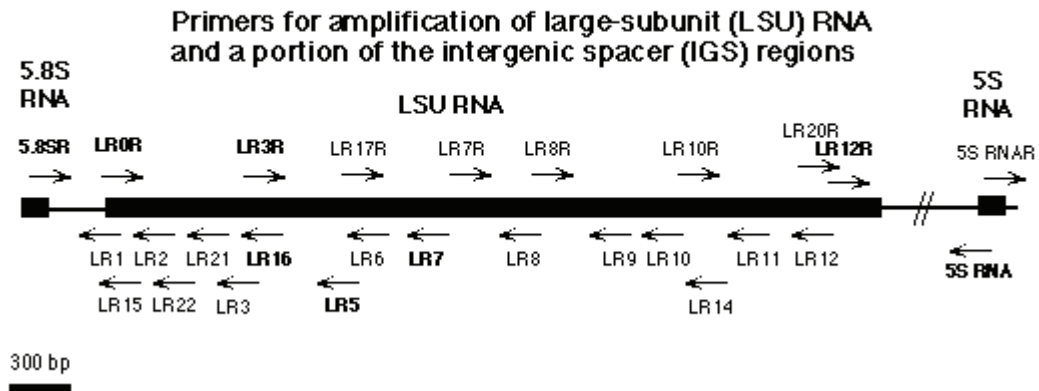


Figure 13 : Amorces encadrant la région LSU [79].

- **Small subunit SSU (17 -18s)**

La petite sous unité ribosomale SSU est une région plus conservée du génome, qui facilite l'amplification d'un grand nombre de genres fongiques mais également d'eucaryotes non fongiques, comme des parasites protozoaires du genre *Leishmania* ou *Toxoplasma* [27, 35]. Les amorces pouvant être utilisées pour amplifier le gène SSU sont les amorces BMB [87], SR [82], NS [80] et EIN [75] (Figure 14).

Small subunit RNA (SR) primers:

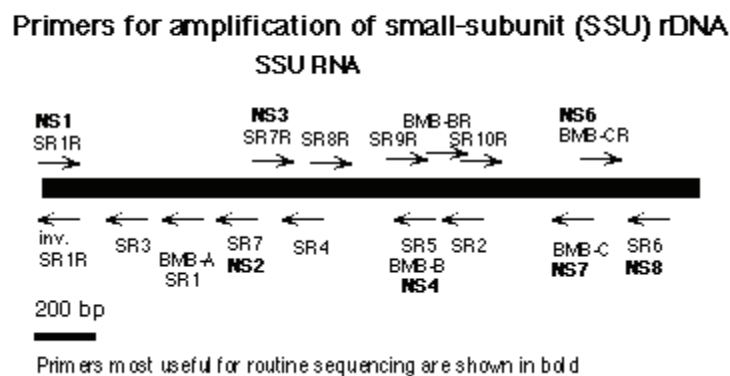


Figure 14 : Amorces encadrant la région SSU [79].

- **Intergenic spacer (IGS)**

La plus grande quantité de séquences variables dans le gène ribosomal se trouve dans la région IGS. Plusieurs modèles d'organisation peuvent être retrouvés dans les différents groupes de champignons. La plupart des Basidiomycètes filamenteux ont une seule région IGS ininterrompue (entre la fin du gène LSU et le début du gène suivant SSU). L'amplification de la région IGS entière requiert l'utilisation d'amorces ancrées dans le 3'terminal du gène LSU (comme LR12R) et le 5'terminal de SSU (comme invSR1R) [79]. Chez beaucoup de levures Ascomycètes et presque toutes les levures Basidiomycètes, IGS contient une région codante pour le gène de l'ARN 5s qui divise IGS en deux régions plus petites ce qui le rend plus facile à utiliser pour amplifier. Selon l'orientation et la position du gène de l'ARN 5s, la PCR peut être utilisée pour séquentiellement amplifier l'une ou l'autre portion d'IGS au delà de la région LSU. Les amorces pouvant être utilisées pour amplifier ce gène sont LR12R, invSR1R et 5sRNA [82] (Figure 15).

Intergenic spacer (IGS) primers (including 5S RNA primer sequences for basidiomycete fungi)



Figure 15 : Amorces encadrant les régions IGS [79].

- **Limites des amorces universelles**

Le haut degré de conservation des gènes ribosomaux peut engendrer une variabilité trop faible limitant la différenciation au sein des genres fongiques. Plus encore, certains couples d'amorce ITS non spécifiques sont même capables d'hybrider de l'ADN humain. Au contraire, une variabilité trop importante en nombre et en séquence peut rendre difficile l'identification à partir d'échantillons cliniques.

De plus, le risque principal inhérent aux techniques d'amplification avec des amorces universelles est l'obtention de résultats faussement positifs dus à la contamination des réactions d'amplification par de l'ADN fongique provenant d'une autre source que l'échantillon testé. Loeffler *et al.* [88] dans une étude

destinée à évaluer ce risque ont trouvé un taux de 8 % de réactions positives pour les témoins négatifs placés dans les séries d'amplification. Les sources de contamination peuvent être bien entendu les produits d'amplification générés dans le laboratoire mais également les moisissures présentes dans l'environnement [88] car ce sont des organismes ubiquistes dont des spores sont véhiculées par l'air. Les réactifs commercialisés pour la réalisation des étapes d'extraction ou d'amplification peuvent eux même être à l'origine de résultats faussement positifs en raison de leur contamination par de l'ADN fongique [66]. Pour être en mesure de détecter la survenue d'une éventuelle contamination lors des manipulations, il faut insérer des contrôles négatifs aux différentes étapes de réalisation de la technique (contrôle négatif d'extraction et contrôle du mélange réactionnel d'amplification). On peut également systématiquement contrôler les trousseaux de réactifs avant de les utiliser pour l'extraction d'ADN fongique et se conformer aux recommandations en vigueur concernant la séparation des locaux pour la prévention des risques de contaminations croisées au cours des techniques d'amplification. Les manipulations doivent être réalisées sous hotte à flux d'air laminaire avec du matériel à usage unique.

Ainsi il peut s'avérer difficile d'interpréter la présence d'un ADN correspondant à un champignon commensal ou environnemental. De plus, de part la persistance de l'ADN, celui-ci n'est pas témoin de cellules viables et sa présence ne signe en aucun cas une infection active (que ce soit aigue ou chronique). Il faut donc confronter avec les résultats anatomopathologiques, cytologiques, biologiques et cliniques.

b) La détection ciblée par amorces spécifiques

La détection ciblée d'une espèce donnée en utilisant un couple d'amorces spécifiques d'une séquence de l'ADN de l'espèce considérée est principalement utilisée en PCR quantitative en temps réel. On peut citer en exemple *Aspergillus fumigatus* avec le couple d'amorce Fun-18s-995F / Fun-18s-1217R ou *Candida Albicans* avec Fun-18s-1313F / Fun-18s-1467R [89].

D. *Helicobacter pylori*

1. Découverte

Si la présence de bactéries spiralées dans l'estomac avait été rapportée dès le XIX^{ème} siècle, *Helicobacter pylori* n'a été cultivé pour la première fois qu'en 1982 par Barry Marshall et Robin Warren [90]. *H. pylori* est l'espèce inféodée à l'homme à l'origine des ulcères et du cancer au niveau de l'estomac, ce qui a valu en 2005 le prix Nobel de Médecine à ces deux chercheurs australiens.

2. Classification

Le genre *Helicobacter* appartient à la subdivision des *Proteobacteria*, Ordre des *Campylobacterales*, famille des *Helicobacteraceae*. Les espèces du genre *Helicobacter* font, comme celle de *Campylobacter*, partie des bactéries spiralées du tube digestif. Ils en possèdent les caractères, à savoir une morphologie spiralée ou incurvée, un métabolisme microaérophile et n'utilisant pas les sucres. Ils sont adaptés à la vie dans le mucus et l'acidité et colonisent la muqueuse digestive de l'homme ou d'animaux [91].

3. Caractères morphologiques et biochimiques

Helicobacter pylori existe sous deux formes. Une forme bacillaire, spiralée, longue de 2 à 4 μm et large de 0,5 à 1 μm que l'on ne retrouve naturellement que dans l'estomac des malades infectés. C'est une forme cultivable, mobile par 5 à 7 flagelles polaires et engainés. Elle est caractérisée par sa forme hélicoïdale qui a déterminé l'appellation du genre *Helicobacter*. Si l'on soumet les formes spiralées d'*Helicobacter* à des conditions de stress, la morphologie des bactéries peut évoluer vers des formes en U puis en anneau pour aboutir à des formes rondes dites coccoïdes. Ces formes coccoïdes sont aussi observées *in vivo* dans l'estomac au niveau des lésions de la muqueuse, mais aussi dans la bouche, la plaque dentaire, l'intestin et les selles de patients infectés [91] (Figure 16).

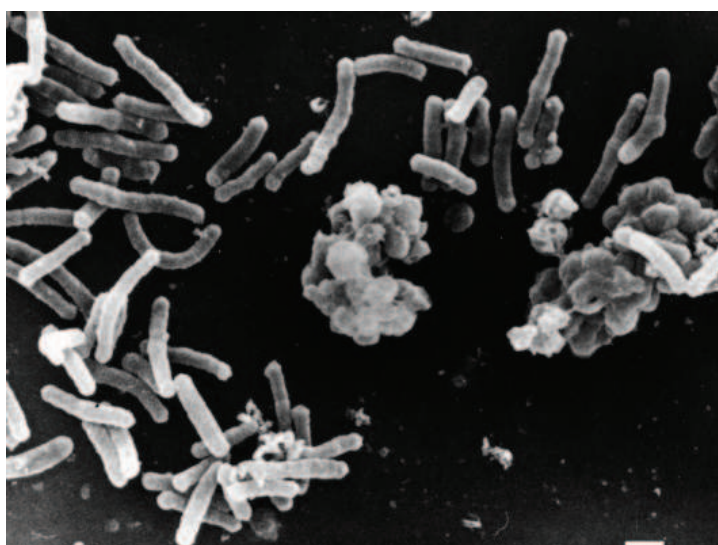


Figure 16 : Vue en microscopie électronique de formes bacillaires et coccoïdes de *H. pylori* (Cliché : Quellard N, Fernandez B, Service de microscopie électronique, CHU Poitiers).

Helicobacter pylori présente des caractères biochimiques particuliers : elle est catalase, oxydase et surtout uréase positive. Ces caractères morphologiques et biochimiques permettent son identification et expliquent le fait qu'elle soit adaptée à son habitat.

4. Aspect épidémiologique et mode de transmission

Helicobacter pylori colonise l'estomac de la moitié de l'humanité et représente la cause majeure des pathologies gastroduodénales [92]. Alors que la prévalence de *H. pylori* a tendance à décroître dans les pays industrialisés avec un tiers des adultes infectés, celle-ci reste supérieure à 50% dans les pays en voie de développement [93, 94]. En France, la prévalence de l'infection est estimée entre 20 et 30% de la population. Elle est plus forte chez les personnes de bas niveau socioéconomique et originaires de pays en développement. Dans les pays industrialisés, la prévalence s'élève progressivement avec l'âge. Le taux d'infection est de 5 à 10% chez l'enfant et atteint 20 à 50% chez l'adulte [91, 93, 94]. Cette

faible prévalence chez la jeune génération suggère un déclin de la prévalence dans les dizaines d'années à venir [94].

La transmission est strictement interhumaine, précoce dans l'enfance et intrafamiliale. La voie de transmission d'*H. pylori* d'un hôte infecté à un nouvel hôte est encore une énigme. Trois voies de transmission sont suspectées : gastro-orale, oro-orale et féco-orale. La possibilité d'une transmission féco-orale faisant intervenir la forme coccoïde, présente en grand nombre dans les selles de patients infectés et pouvant contaminer l'environnement, est encore fortement discutée [91, 93].

5. Habitat

L'homme est le réservoir exclusif d'*H. pylori* et son estomac est le seul site où la bactérie peut être isolée sous forme cultivable. Grâce à son équipement enzymatique et sa morphologie, *H. pylori* est capable de coloniser l'épithélium gastrique humain. Celui-ci constitue une des quatre couches tissulaires qui composent la paroi de l'estomac : la séreuse superficielle, la musculeuse, la sous-muqueuse et la muqueuse séparées par une couche de cellules musculaires lisses la *muscularis mucosae* (Figure 17).

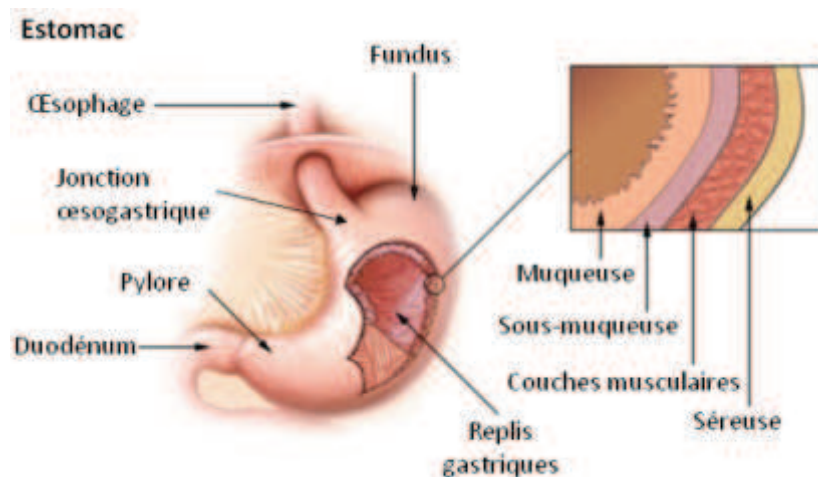


Figure 17 : Représentation schématique de l'estomac et d'une coupe de la paroi gastrique.

La muqueuse est constituée d'un épithélium cylindrique organisé en cryptes, reposant sur la *lamina propria* : chorion vasculaire (Figure 18).

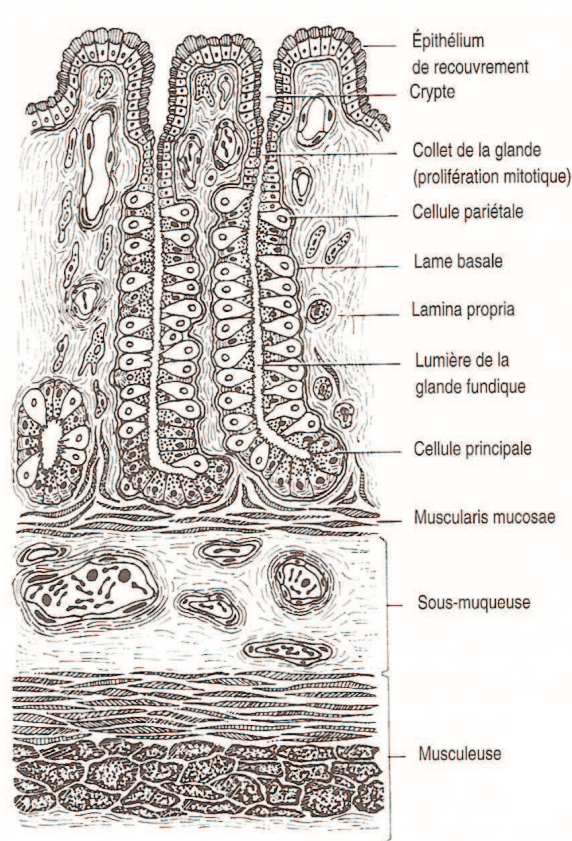


Figure 18 : Ultrastructure de la paroi gastrique [95].

Cet épithélium a une fonction glandulaire de sécrétion du mucus gastrique qui protège l'intégrité du revêtement épithélial de l'acidité gastrique [95]. En réponse à différents stimuli sensoriels (olfaction et gustation), moteurs (mastication) ou biochimiques (hypoglycémie), la sécrétion du suc gastrique est déclenchée. Le suc gastrique consiste en un mélange d'enzymes (pepsinogène et pepsine), de glycoprotéines dont le facteur intrinsèque, de protéines plasmatiques, et surtout d'une sécrétion acide. Cette sécrétion acide est à l'origine d'un pH aux alentours de 5,5 au sein de l'estomac [96]. *H. pylori* possède la remarquable capacité de tamponner l'acidité gastrique via son uréase qui catalyse la transformation de l'urée en ammoniac et dioxyde de carbone. Il arrive ainsi, à faire d'un environnement hostile un lieu où il est une des seules bactéries à pouvoir

subsister. Sa mobilité, assurée par ses 5 à 7 flagelles polaires, lui permet de se déplacer au sein du mucus gastrique [97] et de s'extraire rapidement de cet environnement acide. Ces deux facteurs constituent donc des pré-requis permettant la colonisation de l'épithélium gastrique.

6. Déterminisme pathologique associé à *H. pylori*

L'évolution de la gastrite vers des pathologies sévères répond à des interactions complexes entre les facteurs de virulence bactériens, des facteurs génétiques de susceptibilité individuelle de l'hôte infecté, la localisation de l'infection dans l'estomac et des facteurs environnementaux essentiellement représentés par des pratiques alimentaires [98] (Figure 19).

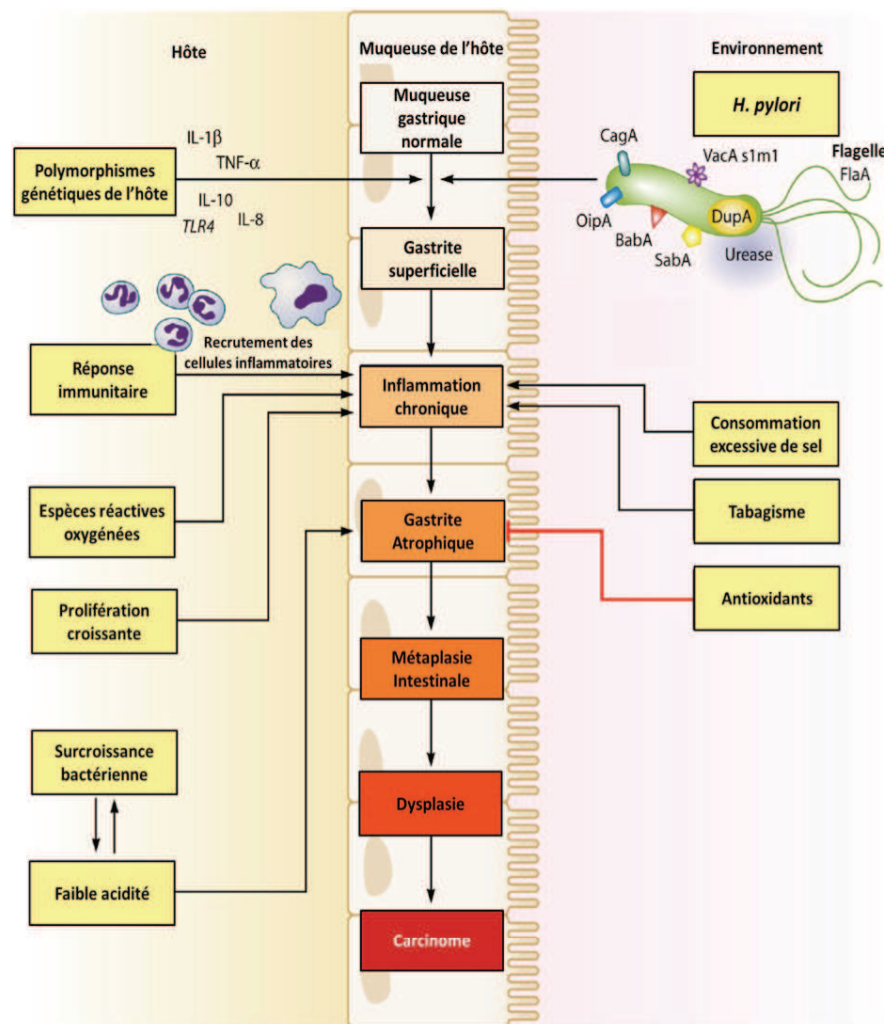


Figure 19 : Déterminisme pathologique associé à *H. pylori* (modifié d'après Wroblewski *et al.*, 2010 [104]).

L'ensemble des souches cliniques d'*H. pylori* exprime des facteurs de colonisation qui lui permettent de survivre à l'acidité gastrique (uréase), de se mouvoir dans le mucus (flagelles), d'adhérer aux cellules de l'épithélium gastrique (adhésines), d'échapper à la réponse immunitaire de l'hôte et de persister de manière chronique (leurres antigéniques, plasticité génomique) [92]. Une partie seulement des souches isolées exprime des facteurs de pathogénicité responsables de lésions plus importantes en altérant l'intégrité de la muqueuse (cytotoxine vacuolisante, VacA) ou en déclenchant puis modulant la nature de la réponse inflammatoire (îlot de pathogénicité, CagA). Les facteurs liés à l'hôte avaient été fortement suspectés par l'observation de familles gravement atteintes par le cancer gastrique. Le support génétique de cette susceptibilité serait représenté par certains polymorphismes de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire : gène de l'interleukine IL-8, de l'IL-1 β et du TNF α (tumor necrosis factor) [92]. Les facteurs environnementaux sont la surconsommation de sel, une alimentation riche en saumures et pauvre en fruits et légumes frais (vitamines) ainsi que le tabagisme et l'alcoolisme [99].

Il existe une corrélation forte entre le niveau de sécrétion acide et la localisation de la gastrite qui est déterminante sur l'évolution de l'infection à *H. pylori*. Les sujets chez qui la sécrétion acide est conservée ou augmentée sont colonisés au niveau de l'antrum où les cellules sécrétrices d'HCl sont peu présentes et développent une gastrite antrale qui pourra conduire à un ulcère duodénal par inflammation du duodénum adjacent. Il avait été noté depuis longtemps que les patients souffrant d'ulcères duodénaux ne développaient jamais de cancer gastrique. Les sujets chez qui la sécrétion acide est diminuée sont colonisés au niveau de l'ensemble de l'estomac, ce qui entraîne une pangastrite qui peut évoluer en plusieurs décennies vers une atrophie de la muqueuse, favorisant l'apparition de métaplasies puis de dysplasies (lésions précancéreuses) pour aboutir à un adénocarcinome gastrique [91, 96, 98, 100, 101, 102, 103] (Figure 20).

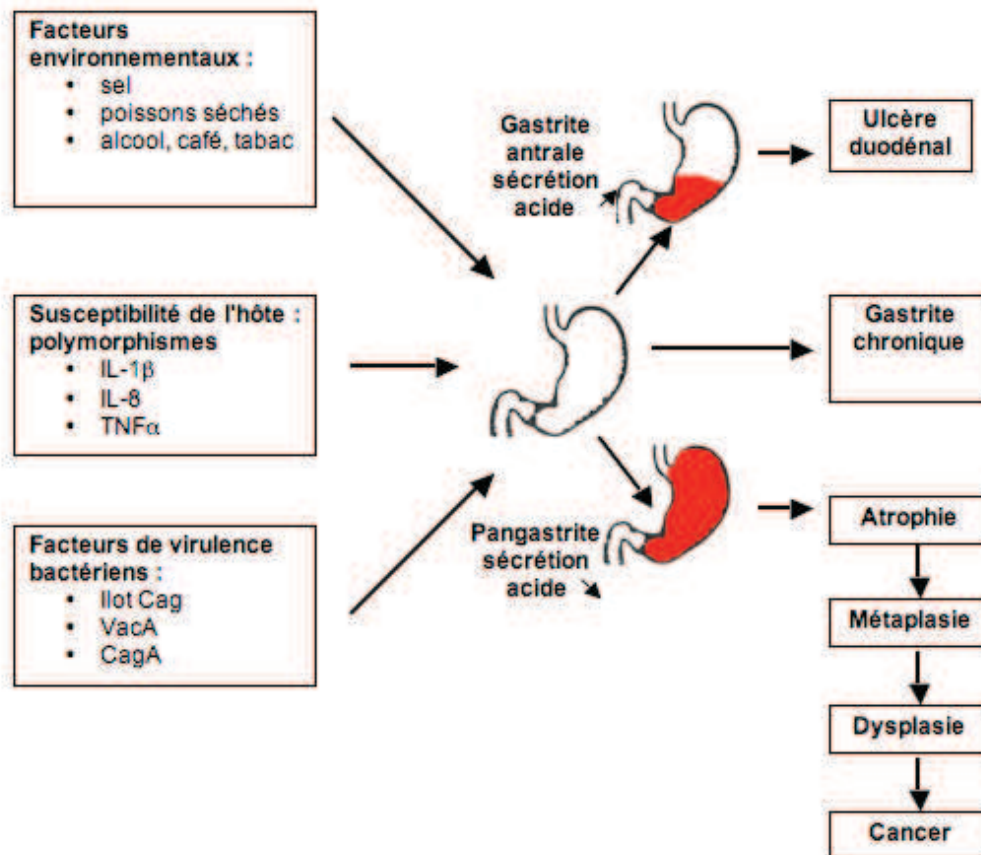


Figure 20 : Corrélation entre le niveau de sécrétion gastrique, la localisation de la gastrite et l'évolution de l'infection à *H. pylori*.

7. Pouvoir pathogène

L'infection à *H. pylori* constitue un modèle d'infection bactérienne chronique. On sait depuis plusieurs années que cette bactérie est impliquée dans la survenue de pathologies gastroduodénales, mais également hématologiques.

L'infection à *H. pylori* conduit constamment à une inflammation de la muqueuse gastrique appelée gastrite, le plus souvent asymptomatique. Dans 90% des cas, elle devient chronique et persiste des décennies voire toute la vie de l'hôte en l'absence de traitement d'éradication. Elle peut évoluer vers des pathologies plus sévères comme les ulcères gastriques ou duodénaux dans 10% des cas, le cancer gastrique dans 1% des cas ou, beaucoup plus rarement, le lymphome de MALT (mucosa associated lymphoid tissue) [91,92, 96] (Figure 21).

L'éradication de la bactérie de la muqueuse gastrique entraîne la guérison de la gastrite, des ulcères et de certains lymphomes du MALT, empêche les rechutes et prévient l'évolution vers le cancer gastrique [91].

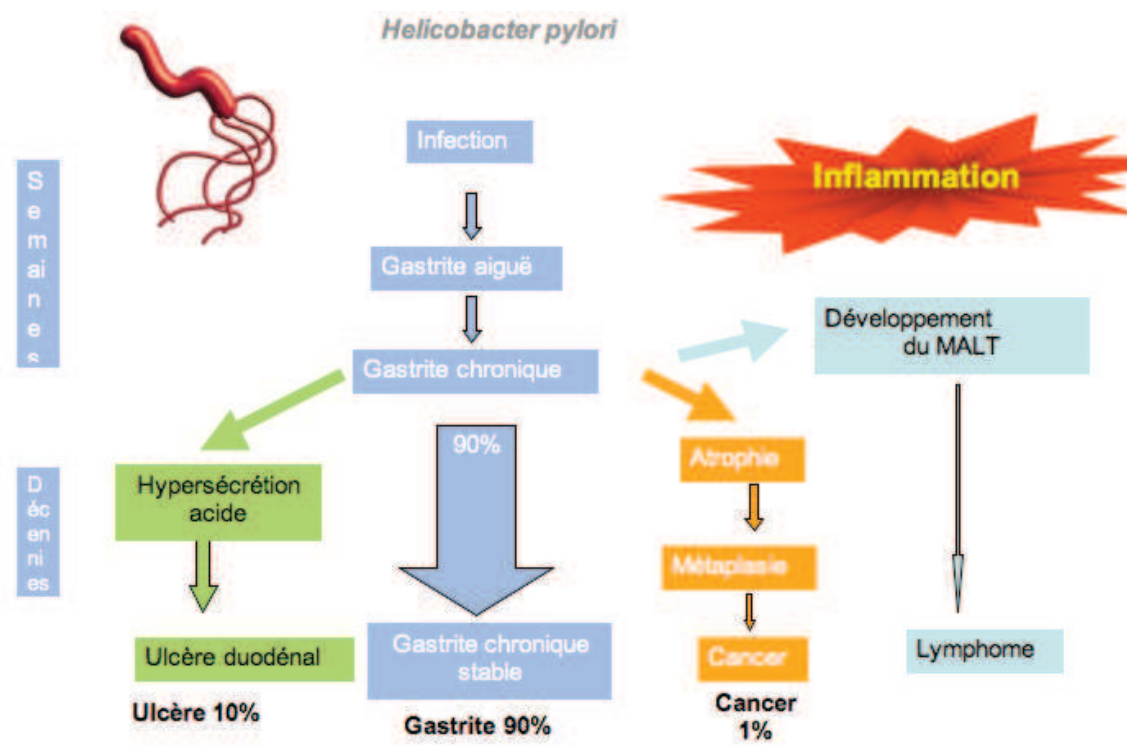


Figure 21 : Histoire naturelle de l'infection à *H. pylori*.

a) Gastrite

La lésion de base de l'infection à *H. pylori* est une gastrite, c'est à dire une réaction inflammatoire de la muqueuse gastrique avec infiltration de polynucléaires et de lymphocytes. Il s'agit d'une définition histologique car la gastrite est le plus souvent asymptomatique. Cette gastrite aiguë survient toujours en présence d'*H. pylori*. Généralement, il n'y a pas de clairance spontanée de la bactérie chez l'adulte [98]. La gastrite chronique résulte de la persistance de l'infection à *H. pylori*. Elle peut être antrale, pangastrique ou prédominer au niveau du fundus. Elle consiste en un remaniement ultra structural de la paroi gastrique avec perte des jonctions cellulaires, ballonnisation cellulaire, perte de la forme cellulaire, des microvillosités, et désorganisation du cytosquelette. La gastrite chronique est d'abord

superficielle, les modifications inflammatoires étant limitées à la *lamina propria*, puis atrophique : l'infiltrat s'étend jusqu'aux plans profonds de la muqueuse [105].

b) Ulcères

Les ulcères gastriques et duodénaux se caractérisent par des lésions d'au moins 0,5 cm de diamètre pénétrant jusqu'à la couche musculaire. La pathologie ulcéreuse est caractérisée par son mode évolutif par poussées. Les symptômes se résument essentiellement à des épigastalgies calmées par la prise alimentaire ou la prise d'anti-acides [105]. Ces deux types d'ulcères sont fortement associés à *H. Pylori* (70% pour l'ulcère gastrique contre 90% pour l'ulcère duodénal) et se développent dans les sites où l'inflammation est la plus sévère [96, 106]. Il y a une potentialisation avec la consommation d'anti-inflammatoire non stéroïdien (AINS) et/ou aspirine (l'autre facteur principal d'ulcérisation) [106]. L'éradication d'*H. pylori* permet la cicatrisation de l'ulcère et prévient sa récurrence [107, 108]

c) Atrophie gastrique et métaplasie intestinale

L'inflammation chronique induite par *H. pylori* peut entraîner une atrophie gastrique par destruction des glandes gastriques. Peut s'y rajouter l'apparition de zones de métaplasie intestinale, ce qui correspond à une perte de l'architecture normale de la muqueuse gastrique provoquant la mise en place d'un épithélium de type intestinal. Cet état de gastrite atrophique et métaplasie intestinale a lieu chez 50% des patients infectés par *H. pylori* et aux endroits où l'inflammation est la plus sévère. Le risque de gastrite atrophique dépend de la distribution de l'inflammation chronique active [98].

d) Dysplasie

A terme, l'évolution se fait vers la dysplasie en rapport avec une dysfonction des cellules situées au fond des cryptes et, avec pour conséquences, des anomalies architecturales et cytologiques. La dysplasie fait le lit du cancer gastrique et constitue à ce titre, une lésion précancéreuse [96].

e) Cancer gastrique

Sur le plan histologique, le carcinome gastrique se présente sous deux formes : le cancer gastrique diffus constitué de cellules néoplasiques individuelles infiltrantes qui ne forment pas de structures glandulaires et l'adénocarcinome gastrique qui progresse à travers une série d'étapes histologiques décrites précédemment : initié par la transition d'une muqueuse normale vers une gastrite chronique superficielle suivie d'une atrophie gastrique et d'une métaplasie intestinale pour enfin engendrer une dysplasie et un adénocarcinome. Il résulte de la prolifération de cellules ayant acquis des caractères particuliers (perte de l'inhibition de contact et de l'amarrage, immortalité par échappement à l'apoptose et multiplication cellulaire, néoangiogenèse, perte de la sensibilité aux inhibiteurs physiologiques de la croissance cellulaire, autosuffisance).

L'adénocarcinome gastrique est le deuxième cancer digestif en France avec 7000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année. Il est la troisième cause de mortalité par cancer dans le monde après ceux du poumon et du foie [99]. Car même si le taux de mortalité a un peu baissé ces dernières années, il reste conséquent avec un taux de survie inférieur à 30% à 5 ans. Ceci est en partie lié au fait que ce cancer s'accompagne de peu ou pas de symptômes, le plus souvent aspécifique, et ce jusqu'à un stade avancé [94,99]. Du fait de son implication dans la survenue du cancer gastrique, *H. pylori* a été déclarée « Carcinogène de classe I » par l'International Agency for Research on Cancer (IARC) en 1994. Elle est pour le moment la seule bactérie responsable d'un cancer chez l'homme.

f) Lymphome du MALT

Le lymphome du MALT est un lymphome extraganglionnaire de la zone marginale qui se caractérise par une infiltration massive de cellules lymphoïdes dans la *lamina propria* entraînant une destruction des glandes gastriques et la formation de lésions lympho-épithéliales. L'association entre le lymphome du MALT et la présence d'*H. pylori* est établie puisqu'environ 90% des sujets atteints de lymphome du MALT sont infectés à *H. pylori* [96].

g) Pathologies hématologiques

L'infection à *H. pylori*, se traduit par une inflammation locale mais aussi par une réponse immune systémique. C'est via ce deuxième phénomène que l'on suppose la survenue de manifestations autres que digestives telles que les pathologies hématologiques : anémie ferriprive, purpura thrombopénique idiopathique (PTI) et carence en vitamine B12. Cependant, leur physiopathologie n'est pas toujours très claire.

h) Rôle du microbiome sur la pathogénèse d'*H. pylori*

Il y a eu plusieurs études récentes sur la pathogénèse d'*H. pylori* et les co-infections. Dans le modèle macaque, qui est proche des humains, une récente étude a fait le point sur l'impact de la colonisation à *H. pylori* sur la quantité et la composition du microbiome gastrique (bactéries commensales et pathogènes). *H. pylori* devenait l'espèce dominante, représentant 87% de tout le microbiome dans les estomacs infectés. Cependant, en cas d'éradication d'*H. pylori*, seule une partie des individus montrait un impact significatif sur la relative abondance des autres bactéries gastriques [109]. Chez le modèle murin avec cancer humanisé (INS-GAS), il a été rapporté que l'extension, la sévérité et la malignité des lésions induites par *H. pylori* étaient plus favorable en présence d'autres bactéries gastriques qu'en cas de mono infection à *H. pylori* [110]. D'autres études ont confirmés que même la présence d'un microbiome gastrique restreint de seulement trois bactéries commensales améliore les pathologies induites par *H. pylori* et les lésions précancéreuses [110]. Il faut tout de même rester prudent quant à ces résultats obtenus sur des modèles animaux dont la physiologie et le microbiome gastrique diffèrent de celui des humains.

Les conditions environnementales, les traitements et certainement les co-infections peuvent avoir un impact sur le pH et la physiologie gastrique et par la suite sur la colonisation gastrique et ainsi limiter les conditions de cancérisation [98].

8. Diagnostic

a) Indication au diagnostic

Les conférences de consensus recommandent la recherche et l'éradication d'*H. pylori* dans les cas de suspicion de maladie ulcéreuse duodénale ou gastrique, ou de lymphome gastrique de MALT, de gastrite atrophique, de dyspepsie persistante, de lésions gastriques pré néoplasiques et après chirurgie pour cancer de l'estomac. C'est également recommandé chez les patients à risque de cancer gastrique (antécédent familial au premier degré, chirurgie bariatrique par by-pass, prise prolongée d'anti sécrétoires) et en prévention des lésions induites par prise d'AINS ou d'aspirine au long cours. D'autres indications ont été confirmées en cas d'anémie ferriprive ou carence en vitamine B12 inexplicables et de PTI [91, 103, 106, 111, 112] (Tableau 2).

Indication	Niveau de recommandation
Ulcère gastroduodénal, évolutif ou non, incluant les ulcères compliqués	Élevé
Lymphome du MALT	Élevé
Prise d'AINS ou d'aspirine faible dose chez des patients ayant eu un ulcère compliqué ou non.	Élevé
Traitement au long cours par aspirine chez des patients ayant eu un ulcère gastroduodénal hémorragique	Élevé
Prévention des ulcères avant de débiter un traitement par AINS, particulièrement en cas de traitement prolongé, chez des patients sans antécédent d'ulcère et non précédemment traités par AINS	Élevé
Patients ayant une endoscopie pour dyspepsie	Élevé
Traitement au long cours (au moins 6 mois) par antisécétoires gastriques (IPP)	Élevé
Antécédents familiaux de cancer gastrique au premier degré	Moyen
Mutations des gènes de réparation de l'ADN (syndrome de Lynch)	Moyen
Lésions pré-néoplasiques de la muqueuse gastrique : atrophie avec ou sans métaplasie intestinale	Moyen
Antécédents de résection localisée d'un cancer gastrique	Moyen
Anémie par carence en fer sans cause retrouvée	Moyen
Carence en vitamine B12	Moyen
Purpura thrombopénique chronique idiopathique	Moyen
Prévention du cancer gastrique chez les patients devant avoir un by-pass gastrique pour traitement d'une obésité morbide	Faible
Enfants avec des douleurs épigastriques sans étiologie évidente	Faible

Tableau 2 : Recommandations de recherche et d'éradication de *H. pylori* [111].

b) Méthodes diagnostiques

Les méthodes permettant de faire le diagnostic d'une infection à *H. pylori* sont nombreuses et peuvent être regroupées en deux types. Les méthodes diagnostiques invasives nécessitent une biopsie de la muqueuse gastrique obtenue par examen fibroscopique : examen anatomopathologique, culture, détection de

séquences d'ADN spécifique par PCR et recherche d'une activité uréasique. Les autres méthodes diagnostiques sont dites non invasives : test respiratoire à l'urée marquée, détection d'antigènes dans les selles et sérologie.

Les performances de ces techniques sont diverses et nécessitent une stratégie diagnostique associant plusieurs d'entre elles pour obtenir une sensibilité optimale. Certaines de ces techniques n'apportent que la notion de présence ou non d'infection à *H. pylori* (sérologie standard, antigènes dans les selles, test respiratoire, activité uréasique rapide). D'autres offrent la possibilité d'apprécier les conséquences de l'infection sur la muqueuse gastrique (anatomopathologie), d'établir l'antibiogramme et le typage de la souche infectante (culture), de rechercher certains gènes de résistance (culture et PCR sur biopsie). Le choix des techniques à mettre en œuvre sera fonction de l'étendue nécessaire des résultats recherchés et de la possibilité ou non de réaliser une endoscopie. L'exploration des patients repose sur la gastroscopie couplée à la recherche de l'infection par l'examen des biopsies gastriques : anatomie pathologique, culture avec antibiogramme et/ou PCR (détection de la résistance à la clarithromycine et la Lévofoxacine). Le test respiratoire et la sérologie ont confirmé leur intérêt dans le diagnostic non invasif de l'infection chez l'adulte. Le test respiratoire ou la détection antigénique dans les selles sont recommandés chez l'enfant [91, 103, 107, 111, 112].

c) Examen anatomopathologique

Il s'agit du moyen de détection le plus répandu. La sensibilité et la spécificité de cet examen sont supérieures à 95%. Après fixation des biopsies dans le formol, il faut adopter des colorations facilitant la reconnaissance de la bactérie au microscope (Giemsa modifié ou crésyl violet) en plus de la coloration habituelle à l'hémalun-éosine utilisée pour le diagnostic lésionnel mais visualisant mal les bactéries. Cette méthode permet l'examen de la gastrite constamment associée à *H. pylori* et la recherche de complications telles que l'atrophie, la métaplasie intestinale avec dysplasie, le lymphome ou le cancer. La réalisation de biopsies multiples (au moins cinq) augmente la sensibilité de détection de l'infection et permet de classer la

gastrite selon le score de Sydney et d'obtenir une classification opérationnelle en intégrant la topographie des lésions (OLGA, OLGIM) [91, 103, 107, 111, 112].

9. Traitement d'éradication

Depuis 2009, la fréquence élevée des résistances aux antibiotiques en France (23% pour la clarithromycine et 53% pour le métronidazole) impose un changement radical de la stratégie diagnostique et thérapeutique des infections à *H. pylori*. Jusqu'alors, les conférences de consensus recommandaient une stratégie du test and treat utilisant un test non invasif (test respiratoire ou recherche d'antigènes dans les selles) et une trithérapie empirique de 7 à 14 jours comportant un inhibiteur de la pompe à protons (IPP), de l'amoxicilline associé soit à la clarithromycine, soit au métronidazole. L'efficacité de cette stratégie est maintenant trop fortement entamée par l'augmentation des résistances aux antibiotiques responsables d'échecs thérapeutiques chez presque 40% des personnes traitées.

Les nouvelles recommandations européennes et nationales recommandent d'utiliser, chaque fois que c'est possible, une stratégie thérapeutique fondée sur les résultats de test de détection de la résistance aux antibiotiques et principalement à la clarithromycine. L'isolement, la culture et l'antibiogramme sont malheureusement pour l'instant rarement accessibles en dehors de quelques centres spécialisés. La PCR, et surtout la PCR temps réel, sont une alternative intéressante pour leur rapidité et leur relative facilité.

En l'absence d'un recours à l'antibiogramme, les deux traitements empiriques recommandés sont la quadrithérapie séquentielle (5 jours d'IPP associé à l'amoxicilline puis 5 jours d'IPP associé à la Clarithromycine et au Métronidazole) et la quadrithérapie bismuthée (14 jours d'IPP associé au Pyléra : bismuth, métronidazole et tétracycline). Plusieurs études démontrent une très bonne efficacité de ces nouveaux traitements empiriques (95% de réussite) mais ils n'ont jamais été évalués en France où la résistance aux antibiotiques est élevée [91, 103, 107, 108, 111] (Figure 22).

Le contrôle de l'éradication est indispensable car quelque soit le traitement utilisé, aucun n'est efficace à 100%. Il est réalisé à l'aide d'un test non invasif permettant de détecter une infection active. Seuls le test respiratoire et la recherche d'antigènes dans les selles répondent à cette indication. La sérologie n'a pas d'indication dans le contrôle de l'éradication. Les tests doivent être réalisés 4 à 6 semaines après la fin d'un traitement anti sécrétoire ou antibiotique [91, 103, 107, 108, 111]. La vaccination, espoir des dix dernières années, se heurte à une diversité très forte de la bactérie [92].

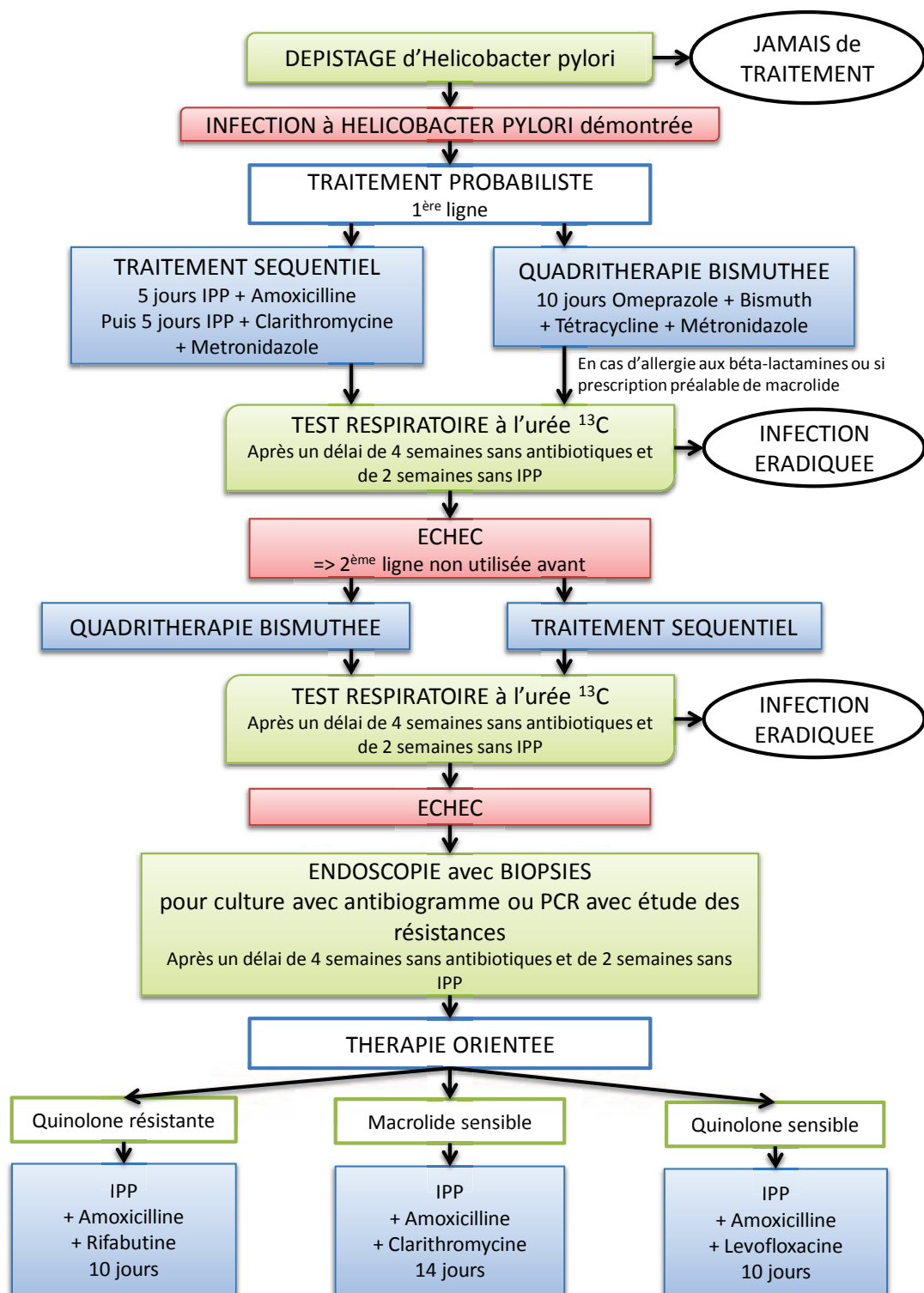


Figure 22 : Arbre décisionnel de la prise en charge thérapeutique de l'infection à *H. pylori* (modifiée d'après GEFH [113]).

III. OBJECTIF

Notre objectif principal est la description du mycobiome gastrique et l'évaluation de l'influence mutuelle du mycobiome gastrique et de l'infection par la bactérie *Helicobacter pylori*.

Nous avons recherché la présence d'ADN fongique sur une large série de biopsies gastriques (n=466) de patients infectés ou non par la bactérie *H. pylori*, présentant les différentes pathologies gastro-duodénales dues à cette infection pro-inflammatoire.

C'est dans ce but que nous avons développé une technique d'identification moléculaire des champignons par PCR ITS avec séquençage par la méthode de Sanger.

Puis nous avons étudié le lien entre la présence fongique au niveau gastrique et l'infection à *H. pylori*. Nous avons également pris en compte d'autres facteurs cliniques et démographiques tels que l'expression clinique des infections à *H. pylori*, l'âge, le sexe et le pays de naissance des patients.

IV. MATERIEL & METHODE

A. Échantillons utilisés pour la mise au point de la technique

1. Collection de levures et champignons filamenteux

Les souches de *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton rubrum*, *Fonsecae anubica*, *Altenaria sp.*, *Scedosporium apiospermum*, *Cladosporium sp.*, *Penicillium expansum* et *Scopulalopsis sp.* ont été isolées de prélèvements cliniques au service de Mycologie du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Poitiers et identifiées par spectrométrie de masse Maldi-tof (Biomérieux) sur culture. Les deux souches de *Kazachstania heterogenica* nous ont été fournies par le Docteur B. Flahou (Université de Gand). Elles ont été isolées de gerbilles de Mongolie utilisées pour les recherches à l'origine de l'article « Gastric Infection with *Kazachstania heterogenica* Influences the Outcome of a *Helicobacter suis* Infection in Mongolian Gerbils. » [44].

La culture des différentes souches a été réalisée sur gélose Sabouraud (Biomérieux), gélose GC (Biorad) et /ou gélose chromogénique Can2 (Biomérieux) incubées à 26 +/- 1,5 °C et 36 +/- 1,5 °C.

2. Échantillons tissulaires

Une biopsie de sinus maxillaire positive à *Candida inconspicua* et une biopsie vulvaire positive à *Candida albicans* identifiées par spectrométrie de masse Maldi-tof (Biomérieux) sur culture ont été testées.

B. Échantillons utilisés pour l'étude

Notre étude a été réalisée rétrospectivement sur des biopsies gastriques recueillis soit dans le cadre de la routine au secteur de Bactériologie du CHU de Poitiers de décembre 2013 à juillet 2014, soit dans le cadre de l'étude prospective et multicentrique française : PHRC Pylorikine, CHU de Poitiers, protocole #09.10.23 « Lésions gastro-duodénales sévères liées à *Helicobacter pylori* : rôle de la réponse anti-infectieuse Th17 » ayant inclus 1214 patients de février 2011 à avril 2013.

Les critères d'inclusion des sujets étaient : hommes ou femmes, majeurs, pour lesquels une indication de fibroscopie gastro-duodénale avec biopsies a été posée. Ils devaient être affiliés ou ayant droit à la Sécurité sociale et avoir donné leur consentement éclairé et signé. Les critères de non-inclusion des sujets spécifiques à la présente étude étaient les personnes mineures, femmes enceintes, allaitantes ou parturientes, antécédents de chirurgie gastrique et oesophagienne ou de traitement d'éradication de *H. pylori*, personne privée de liberté par décision de justice ou administrative, majeur sous mesure de protection légale, personne hospitalisée sans consentement, personne admise dans un établissement sanitaire ou social, personne incapable de donner par elle-même son consentement. Les critères de non-inclusion des sujets spécifiques à toute réalisation de fibroscopie avec biopsie étaient allergies aux anesthésiques locaux, contre-indications à la réalisation d'une fibroscopie selon les recommandations de la Société Française d'Endoscopie Digestive : patient suspect d'une perforation gastrique ou présentant une insuffisance cardio-respiratoire aiguë non contrôlée par la réanimation et contre-indications aux biopsies per-endoscopiques : traitement anti-coagulant à dose efficace et thrombopénie ou thrombopathie sévère ou déficit sévère de la coagulation. Les critères de non-inclusion étaient aussi des critères d'exclusion en particulier pour les traitements non autorisés : antibiotiques (amoxicilline, clarithromycine, tétracycline, ...) et IPP (omeprazole, lansoprasole,...).

Après l'inclusion des patients pour lesquels une fibroscopie gastro-duodénale était indiquée, les médecins investigateurs ont complété les données cliniques et épidémiologiques. La fibroscopie oeso-gastro-duodénale réalisée chez ces patients a permis de visualiser les lésions macroscopiques de la muqueuse : ulcère gastrique ou duodénale, gastrite, suspicion de cancer. Les biopsies antrales et fundiques

réalisées dans le cadre normal de l'examen ont permis d'évaluer les lésions histologiques de l'infection : gastrite, atrophie, métaplasie, dysplasie, cancer, ulcère gastrique, ulcère duodénal. Les lames et les blocs d'inclusion des biopsies pour lesquels des lésions précancéreuses ou cancéreuses ont été détectées par les centres investigateurs ont été adressés au service d'Anatomie et cytologie Pathologiques du CHU de Poitiers pour être relus par les deux anatomopathologistes référents. Deux biopsies antrales ont été pratiquées en plus des biopsies réalisées dans le cadre normal de leur prise en charge, pour les besoins propres au protocole PYLORIKINE. Ces biopsies ont été introduites dans deux tubes à congélation identifiés et immédiatement immergés dans de l'azote liquide puis stockés dans un congélateur à -80°C. Ces biopsies congelées ont ensuite été collectées et acheminées dans le Laboratoire Inflammation et Cytokines (LITEC EA 4331) de l'Université de Poitiers dans de la carboglace pour y être stockées à -80°C en congélateur jusqu'à utilisation. Les deux biopsies ont été broyées à froid. L'autre biopsie dans le second tube a permis la culture de *H. pylori* pour isoler les éventuelles souches infectantes et tester la sensibilité à la clarithromycine. Les souches isolées ont été conservées à -80°C pour une durée indéterminée.

Chaque échantillon a été catégorisé à partir des résultats de la fibroscopie gastrique en se basant sur l'histologie en 9 groupes: muqueuse normale, muqueuse subnormale, ulcère duodénale, ulcère gastrique, gastrite, atrophie, métaplasie, dysplasie ou cancer.

C. Protocole

Les étapes :

La technique d'identification moléculaire des champignons par PCR ITS s'effectue par séquençage des régions ITS des gènes d'ARN ribosomiaux par la méthode de Sanger adaptée à la technologie des « dye terminators », ddNTPs marqués par des fluorochromes différents en 3' et lecture par électrophorèse capillaire (Figure 23).



Figure 23 : Étapes de la technique d'identification moléculaire des champignons.

1. Extraction de l'ADN fongique

a) Prétraitement des échantillons

Dans le cas d'une culture fongique, une öse de 10 µl de culture prélevée sur la gélose a été diluée dans 5 ml de sérum physiologique. La suspension de champignon obtenue a ensuite été centrifugée 10 minutes à 3000 tours/minute afin d'obtenir un culot de culture. Dans le cas de biopsie gastrique, un broyage au scalpel a été effectué stérilement.

b) Méthode d'extraction thermique « boiling/freezing »

Nous avons utilisé la technique décrite par Flahou et al [44] modifiée. L'extraction de l'ADN par la méthode thermique dite « boiling/freezing » a utilisé 500 µl de tampon boiling (0,6055 g de Tris base et 0,19 g d'EDTA (éthylène diamine tétra-acétique) pour 500 ml) dans lequel on été dilué 10 µl de culot de culture ou de broyat de biopsie gastrique. On a ensuite alterné des incubations de 15 minutes à -80°C (dit « freezing ») puis 15 minutes à +100°C (dit « boiling ») et ce trois fois de suite. Les extraits ont ensuite été ramenés à température ambiante.

c) Méthode d'extraction thermique « boiling »

La méthode d'extraction thermique dite « boiling » a consisté en une incubation de 10 minutes à +100°C dans un tampon de boiling (0,6055 g de Tris base et 0,19 g d'EDTA pour 500 ml) dans lequel on a mis en suspension 10 µl du culot de culture.

d) Méthode d'extraction manuelle

L'extraction manuelle de l'ADN fongique a été réalisée à l'aide du kit Qiaamp DNA Minikit (QIAGEN) sur 10 µl du culot de culture, selon les recommandations du fournisseur.

e) Méthode d'extraction automatisée

L'extraction automatisée de l'ADN fongique a été réalisée à l'aide de l'automate extracteur Diagnosis MagNA Pure Compact (Roche diagnostics) après réaction de lyse à l'aide d'un mélange de 380 µl tampon de lyse Roche : MagNA Pure Bacteria Lysis Buffer (Roche diagnostics) et 40 µl de Protéinase K concentrée à 20 mg/L (Eurobio), selon les recommandations du fournisseur.

Les extraits d'ADN que nous avons utilisé ont été obtenus grâce à l'extraction par méthode automatisée à l'aide de l'automate extracteur Diagnosis MagNA Pure Compact (Roche diagnostics) après réaction de lyse sur les biopsies antrales. Par ailleurs, tous les échantillons d'extrait d'ADN testés ont été dupliqués afin d'être traité purs et dilués au dixième dans de l'eau distillée de qualité biologie moléculaire Mol Bio grade (S prime).

2. Amplification génique

La région flanquée par ITS1 et ITS2 a été amplifiée avec les amorces ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3') et ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3') de l'ADNr fongique décrites par White *et al.* en 1990 [80] (Figure 24). Les séquences obtenues ont une taille très variable comprise entre 300 et 900 paires de bases.



Figure 24 : Couple d'amorce ITS1/ITS4 qui amplifie les régions ITS1 et ITS2 et le gène codant pour l'ARNr 5,8S.

Les mélanges réactionnels de (PCR) d'un volume final de 50 μ l ont été préparés avec 125 nmol de $MgCl_2$ à 25 mM (ThermoScientific), 5 μ l de TrueStart Taq Buffer 10X (ThermoScientific), 10 nmol de dNTPs à 10 mM (Euromedex) , 1.25 U de TrueStart Hot Start Taq DNA polymerase à 5 U/ μ l (ThermoScientific), 25 pmol de chaque amorce ITS1 et ITS4 à 10 μ mol/L (Eurogentec) et 5 μ l d'extrait d'ADN (en doublon pur et dilué au dixième). La réaction d'amplification était effectuée sur le thermocycleur GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) selon le protocole suivant : après une étape de dénaturation initiale de 3 minutes à 94 °C, 45 cycles avec une dénaturation (94 °C, 30 secondes), une hybridation des amorces (48 °C, 30 secondes) puis une élongation (72 °C, 45 secondes) ont été effectuées et suivies d'une élongation finale de 15 minutes à 72 °C.

Chaque série d'amplification comprenait un témoin négatif composé d'eau distillée de qualité biologie moléculaire Mol Bio grade (S prime) sans ADN fongique afin de détecter d'éventuels contaminants dans les tampons et réactifs et un témoin positif composé d'extrait d'ADN génomique fongique utilisé pour vérifier l'efficacité de l'amplification génique.

La taille et la pureté des fragments d'ADN amplifiés étaient vérifiées par électrophorèse en gel d'agarose (1,8 %) dans une solution de Tris-borate-EDTA (TBE) 0,5 X. La migration des échantillons s'effectue à 100 volts pendant 60 minutes et les fragments d'ADN ont été visualisés sous lumière ultraviolet (UV) après marquage au Gel Red nucléic acid gel stain (Fluoprobes Interchim). La purification des produits PCR a été réalisée en utilisant un kit de purification PCR QIAquick (QIAGEN). Certains échantillons ont été dilués dans de l'eau distillée de

qualité biologie moléculaire Mol Bio grade (S prime). Le facteur de dilution dépend de l'intensité de la bande visualisée sous UV.

3. Séquençage

Pour chacun des amplifiats, deux réactions de séquençage étaient effectuées : l'une avec l'amorce sens ITS1 et l'autre avec l'amorce antisens ITS4. Le séquençage de l'ADN a été réalisé en utilisant la méthode de terminaison de chaîne Sanger à l'aide du kit de séquençage Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Les mélanges réactionnels de séquençage pour chacune des amorces d'un volume final de 20 µl étaient préparés avec 3 µl de sequencing buffer à 5X (Applied Biosystems), 2 µl de Big Dye Terminator Reaction Mix (Applied Biosystems), 3,2 pmol d'amorce (Eurogentec) à 3,2 µmol/L et 2 µl de produit amplifié et purifié. La réaction de séquençage était réalisée sur le thermocycleur 9700 (Applied Biosystems) selon le protocole « séquençage » suivant (unique quelque soit l'amorce) : après une étape de dénaturation initiale d'une minute à 96 °C, sont effectués 25 cycles comprenant une dénaturation (96 °C, 10 secondes), une hybridation des amorces (50 °C, 5 secondes) puis une élongation (60 °C, 3 minutes). Les produits de séquençage étaient ensuite purifiés à l'aide du kit de purification DyeEx 2.0 Spin (QIAGEN).

Les produits de séquençage purifiés ont été analysés avec le protocole de séquençage « IVD Seq_Std_BTdv3.1_Assay_POP7 » sur le séquenceur 3500Dx Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

4. Analyse des séquences

Les séquences nucléotidiques brutes ont été traitées avec les logiciels Sequencing Analysis (Applied Biosystems) et BioEdit Sequence Alignment Editor (Ibis Biosciences). Les séquences nucléotidiques brutes ont été corrigées à l'aide des électrophorégrammes des séquences sens et des séquences antisens. Les deux séquences (sens et antisens) ont ensuite été alignées pour obtenir une séquence dite « consensus ». A partir de ces séquences consensus, nous avons pu déterminer

l'espèce correspondante à l'aide du programme d'alignement BLAST qui compare avec des séquences de références. Nous avons utilisé plusieurs bases de données disponibles sur internet : NCBI, Mycobank, Unite, DDJB-NIG, Biolomics, Silva et EMBL-EBI.

5. Analyse statistique

L'analyse statistique des résultats obtenus a été faite grâce à la mesure d'indépendance de deux caractères par le test du Khi-deux avec un risque à 5 % et la comparaison de deux moyennes par le test de Student avec un risque à 5%. Lors de cette étude statistique, nous avons considéré comme inflammatoires les histologies gastriques suivantes : ulcère gastrique, gastrite, atrophie, métaplasie, dysplasie et cancer.

V. RESULTATS

A. Mise au point de la technique d'identification moléculaire

Pour pouvoir décrire le microbiome fongique de l'estomac, nous avons besoin d'une technique d'identification des champignons précise et efficace sur des échantillons tels que les extraits des biopsies gastriques que nous voulions étudier. Après étude bibliographique, nous avons décidé de mettre en place une technique d'identification moléculaire des champignons par PCR et séquençage ITS au niveau du plateau de biologie moléculaire du département des agents infectieux du CHU de Poitiers.

1. Extraction manuelle sur cultures fongiques

Pour notre premier essai, nous avons utilisé des cultures de souches d'*Aspergillus fumigatus* et *Kazachstania heterogenica*. L'extraction de l'ADN fongique a été réalisée par méthode d'extraction manuelle (kit Qiamp DNA Minikit QIAGEN) sur une prise d'essai de 50 µl du culot de centrifugation. Après amplification génique et électrophorèse en gel d'agarose, nous n'avons pas visualisé sous lumière UV de bandes de tailles attendues (supérieures à 300 pb) correspondant à des fragments d'ADN fongique amplifiés (Figure 25).

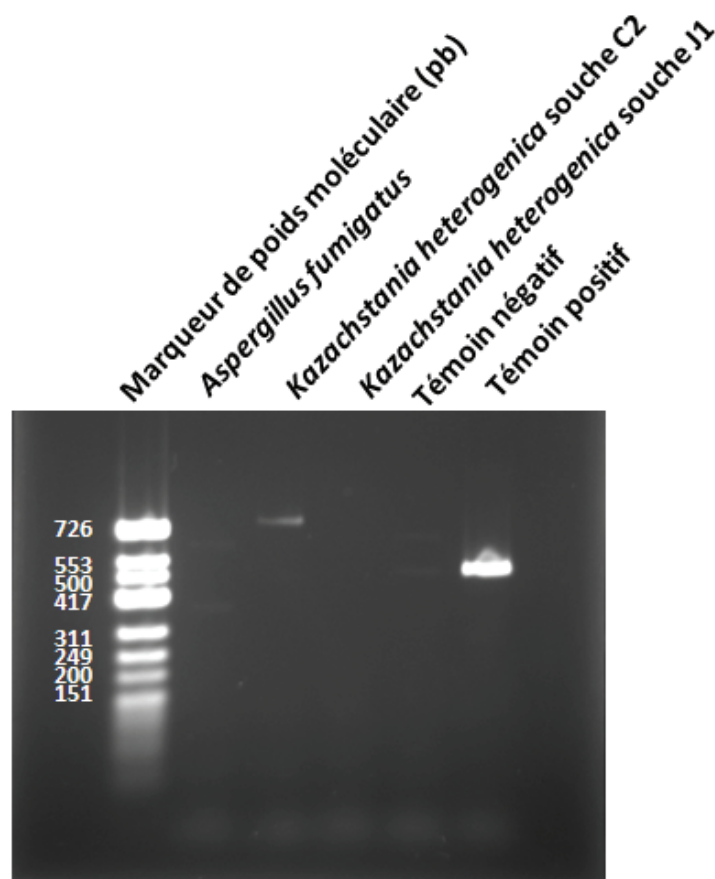


Figure 25 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés après extraction manuelle (Qiagen) de l'ADN à partir de cultures fongiques d'*A. fumigatus* et de *K. heterogenica*.

Les témoins d'amplification génique positifs et négatifs étant conformes, nous avons conclu qu'il s'agissait d'un échec de l'extraction manuelle de l'ADN fongique. Les deux hypothèses que nous avons soulevées étaient une méthode d'extraction insuffisamment puissante ou une prise d'essai inadaptée.

2. Extraction thermique « boiling/freezing » sur cultures fongiques

Lors de notre étude bibliographique, nous nous sommes intéressé à l'article « Gastric Infection with *Kazachstania heterogenica* Influences the Outcome of a *Helicobacter suis* Infection in Mongolian Gerbils. » de Flahou et al. [44] dans lequel l'extraction de l'ADN fongique utilisée était la méthode d'extraction thermique

« boiling/freezing ». La technique utilisée permettait aux auteurs d'extraire à la fois l'ADN fongique et l'ADN d'*Helicobacter* ce qui correspondait à nos objectifs.

Nous avons donc testé cette méthode d'extraction thermique « boiling/freezing » sur nos cultures de souche d'*Aspergillus fumigatus* et *Kazachstania heterogenica* avec une prise d'essai de 100 µl de culot de centrifugation. Après amplification génique et électrophorèse en gel d'agarose, nous avons pu observer des bandes de tailles attendues (supérieures à 300 pb) correspondant à des fragments d'ADN fongique amplifiés avec des témoins d'amplification génique positifs et négatifs conformes (Figure 26).

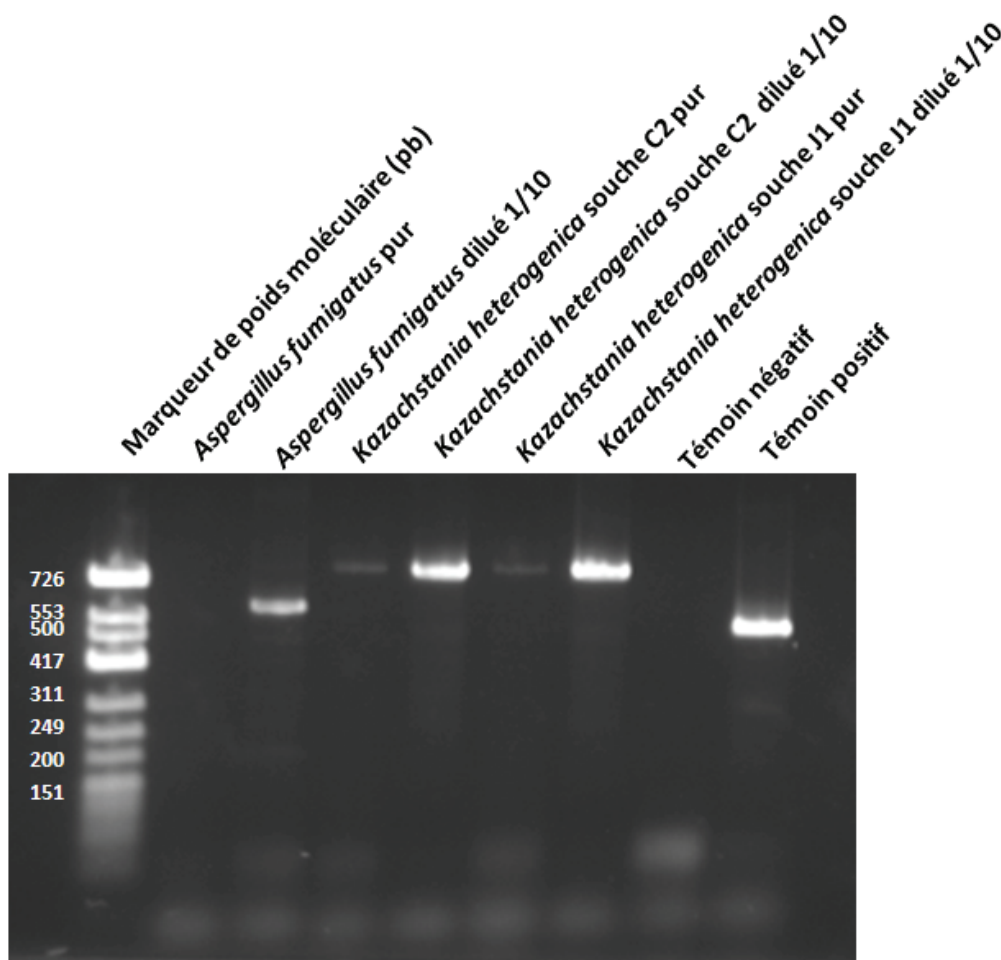


Figure 26 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés après extraction thermique type « boiling/freezing » de l'ADN à partir de cultures fongiques d'*A. fumigatus* et de *K. heterogenica*.

Après purification, nous avons réalisé le séquençage de ces produits de PCR et l'analyse des séquences nucléotidiques a permis d'identifier les souches d'*Aspergillus fumigatus* et *Kazachstania heterogenica* (Figures 27 et 28).



Figure 27 : Séquences nucléotidiques brutes et leurs électrophorégrammes obtenues à partir d'une culture d'*A. fumigatus* et analysées avec le logiciel Bioedit Sequence Alignment Editor.

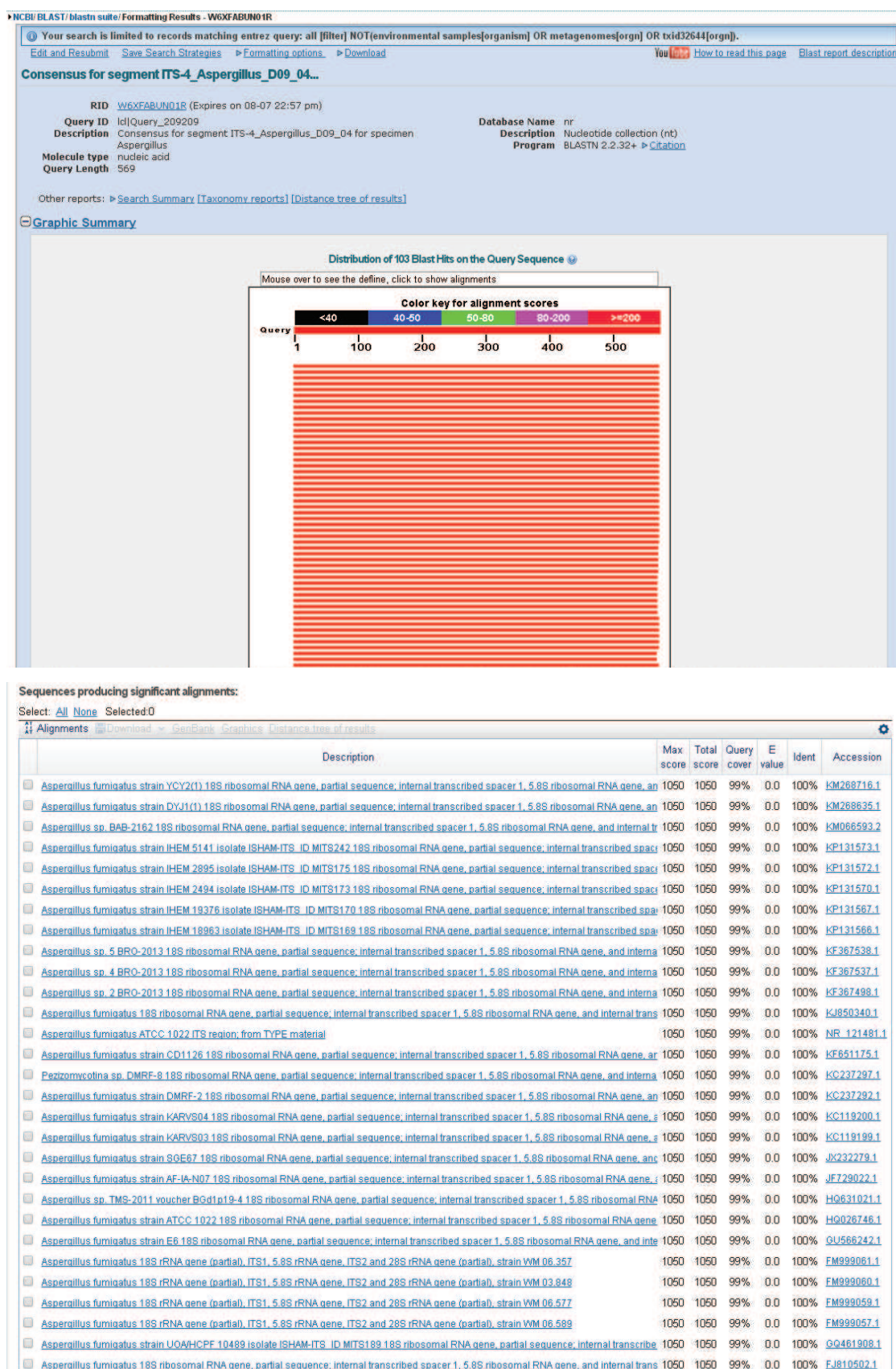


Figure 28 : Résultats de l'alignement de la séquence consensus obtenues par séquençage à partir d'une culture d'*A. fumigatus* avec des séquences de références de la base de donnée NCBI (Genbank).

La méthode d'extraction de l'ADN fongique thermique « boiling/freezing » est donc efficace pour l'identification moléculaire des cultures fongiques par PCR ITS.

Par la suite, nous avons testé cette méthode d'extraction thermique « boiling/freezing » sur des cultures d'autres souches fongiques telles que *Candida albicans*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton rubrum*, *Fonsecaea nubica*, *Altenaria sp*, *Scedosporium apiospermum*, *Cladosporium sp*, *Penicillium expansum*, *Scopulalopsis sp* (Figure 29).

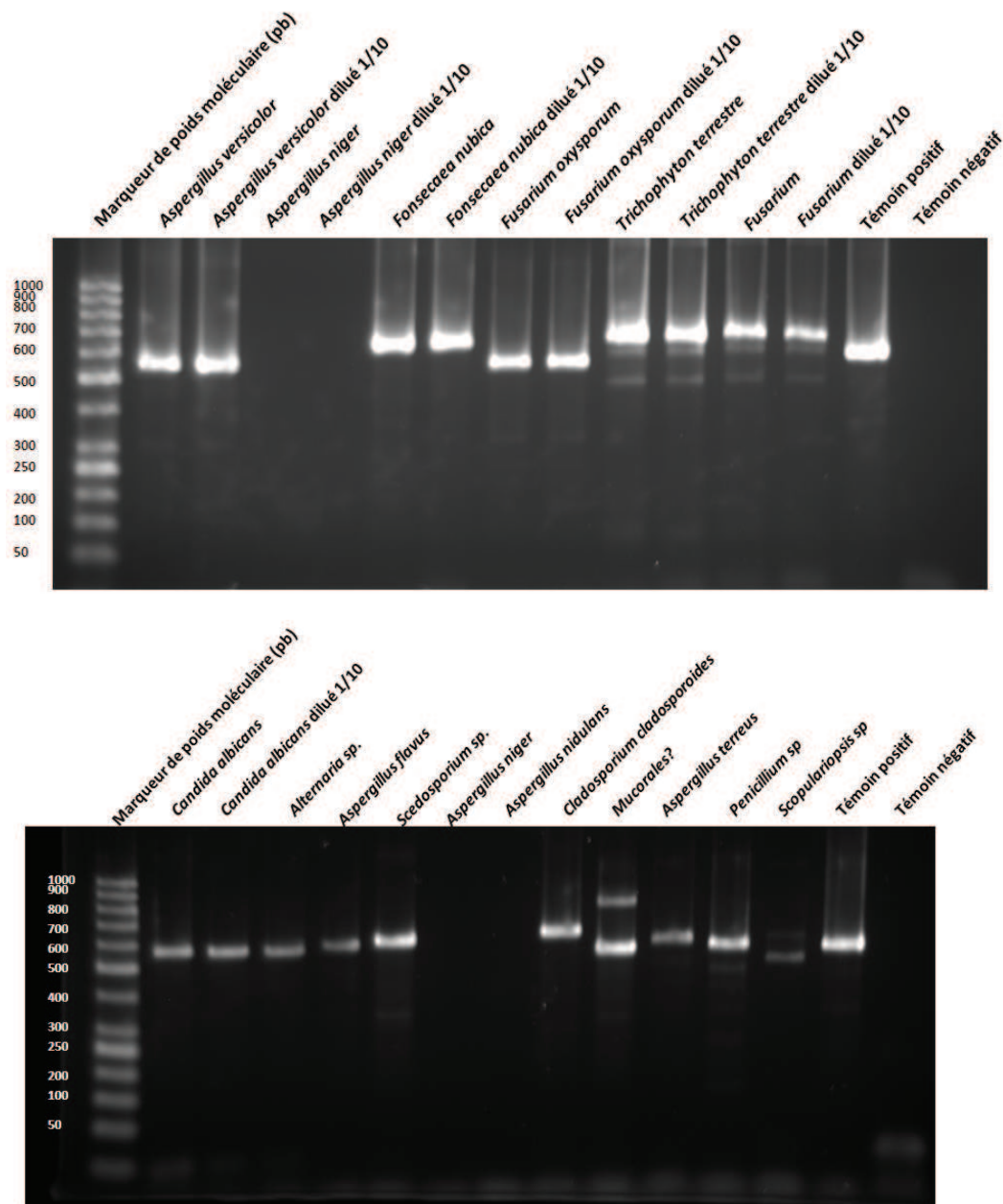


Figure 29 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés par PCR ITS à partir de différentes cultures fongiques.

3. Étude comparative de quatre méthodes d'extraction sur cultures fongiques

Par la suite, nous avons voulu réaliser une étude comparative de quatre méthodes d'extraction de l'ADN à partir de cultures fongiques de souche de *Kazachstania heterogenica*.

- La méthode d'extraction manuelle (Qiagen) avec une prise d'essai de 10 μ l du culot de centrifugation (inférieure aux 50 μ l utilisés lors de notre premier essai).
- La méthode d'extraction « boiling/freezing » avec une prise d'essai de 10 μ l du culot de centrifugation (inférieure aux 100 μ l utilisés lors de notre précédent essai).
- La méthode d'extraction « boiling ».
- La méthode d'extraction automatisée (MagNa pure Roche).

Les résultats de la PCR, révélés par l'électrophorèse en gel d'agarose, montraient l'efficacité des quatre méthodes d'extractions (Figure 30).

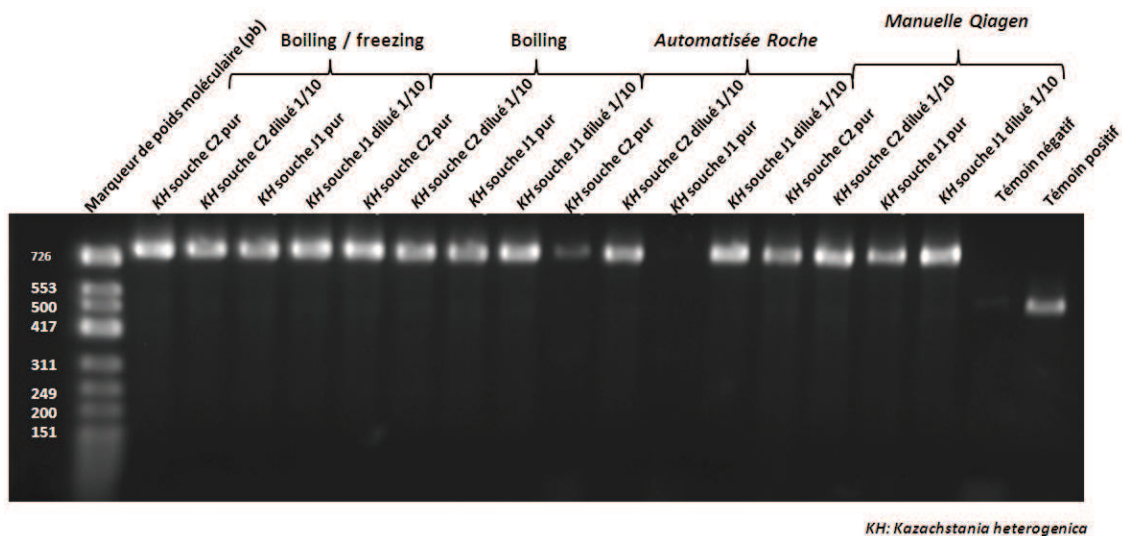


Figure 30 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés : comparaison des différentes méthodes d'extraction de l'ADN sur des cultures fongiques de *K. heterogenica*.

4. Extraction automatisée des biopsies

Dans le cadre de notre étude, cette technique d'identification moléculaire des champignons par PCR et séquençage ITS doit montrer son efficacité sur des extraits de biopsies réalisés par la méthode d'extraction automatisée. Afin de s'en assurer, nous avons voulu tester notre protocole PCR et séquençage ITS sur des biopsies extraites avec la méthode d'extraction automatisée avec un kit MagNa pure Roche. Une biopsie de sinus maxillaire positive à *Candida inconspicua* et une biopsie vulvaire positive à *Candida albicans* ont été testées. Après amplification génique et électrophorèse en gel d'agarose, nous avons pu observer des bandes de tailles attendues correspondant à des fragments d'ADN amplifiés (avec des témoins d'amplification génique positifs et négatifs conformes) pour chacune des deux biopsies testées (Figure 31).

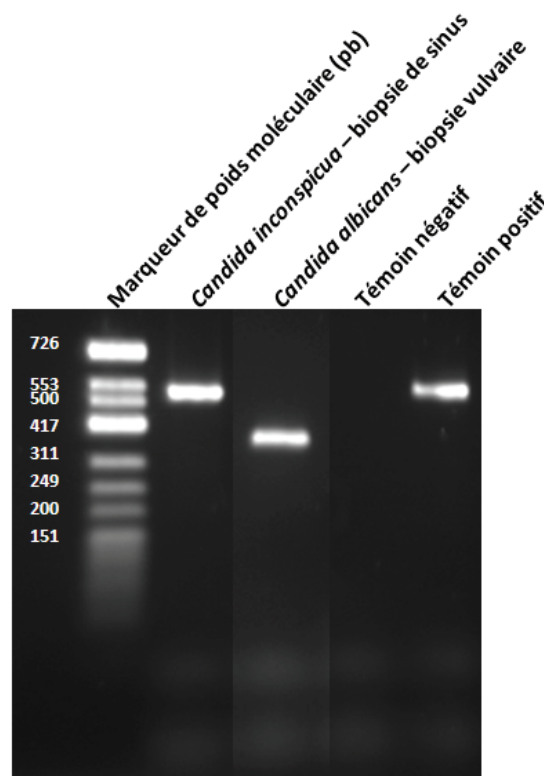


Figure 31 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés à partir de deux biopsies humaines.

Le séquençage et l'analyse des séquences nucléotidiques ont permis d'identifier *Candida inconspicua* dans la biopsie de sinus et *Candida albicans* dans la biopsie vulvaire.

La technique d'identification moléculaire des champignons par PCR ITS est donc efficace sur des extraits de biopsies réalisés par la méthode d'extraction automatisée.

B. Étude des biopsies gastriques

1. Description de la population

Les caractéristiques des patients sont présentées dans le tableau 3.

DESCRIPTIF de la POPULATION		HP -	HP +	TOTAL
Sexe	Masculin	132	101	233
	Feminin	143	90	233
	TOTAL	275	191	466
Histologie	Muqueuse normale	64	1	65
	Muqueuse subnormale	32	0	32
	Ulcère duodéal	19	8	27
	Ulcère gastrique	30	5	35
	Gastrite	85	110	195
	Atrophie	20	32	52
	Métaplasie	20	31	51
	Dysplasie	3	1	4
	Cancer	2	3	5
	TOTAL	275	191	466
Pays de naissance (Pylorikine)	France	259	56	315
	Hors France	16	75	91
	TOTAL	275	131	406
Age moyen		60,5	51,3	56,7

HP+: patients infectées par *H. pylori*

HP- : patients non infectés par *H. pylori*.

Pylorikine : patients issus de l'étude clinique Pylorikine.

Tableau 3 : Description de la population des 466 patients analysés.

2. Analyse des résultats de PCR

Les extraits d'ADN de biopsie gastrique ont été amplifiés par PCR ITS avec, pour chaque série d'amplification, un témoin négatif et un témoin positif. L'électrophorèse en gel d'agarose a permis de visualiser la présence, la taille et la pureté des fragments d'ADN amplifié.

En l'absence de bande visible à l'électrophorèse en gel d'agarose (malgré des témoins positifs et négatifs conformes), la PCR était considérée comme négative (Figure 32). Cela représente 394 des biopsies gastriques, soit 84,5%.

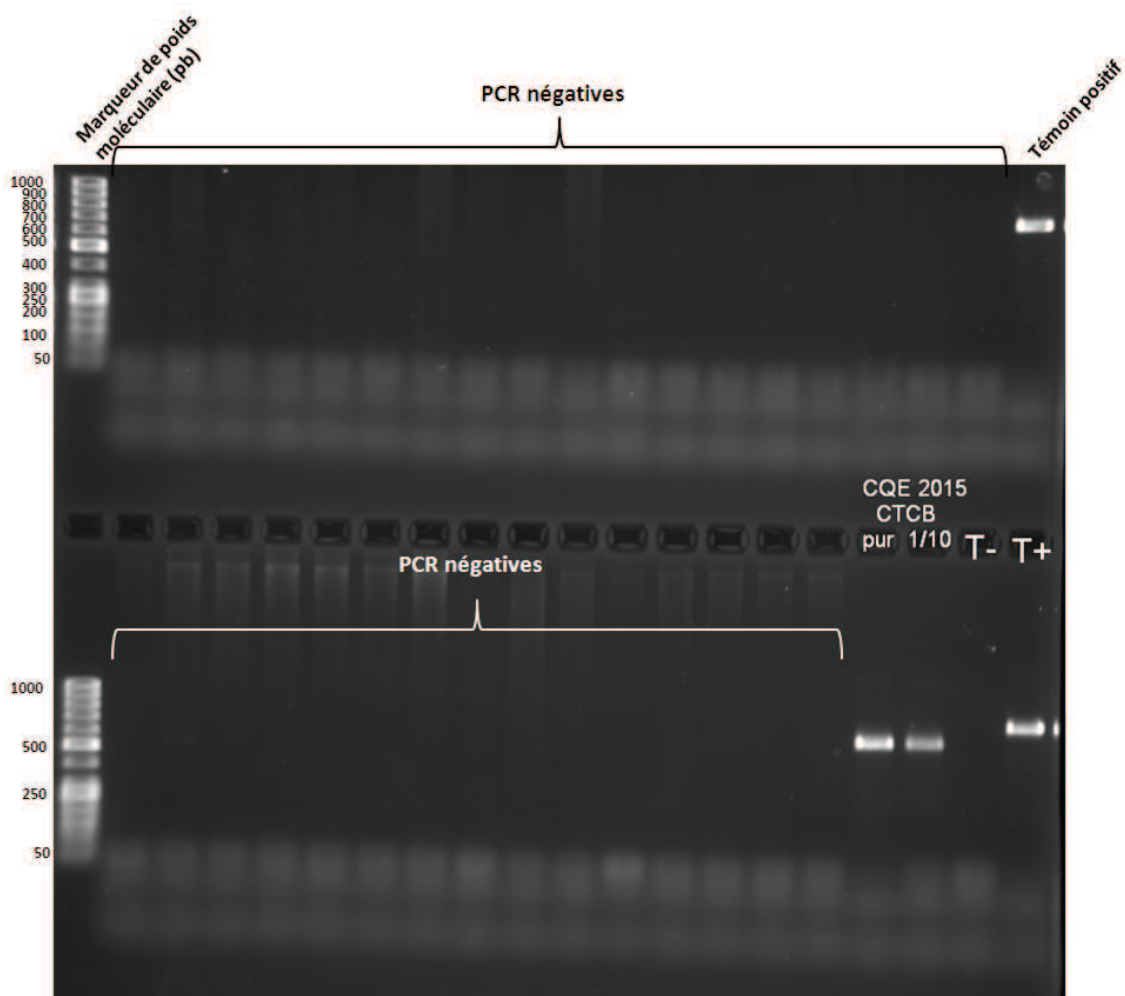


Figure 32 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés à partir des biopsies gastriques : PCR négatives (absence de bande).

En présence de bande visible à l'électrophorèse en gel d'agarose avec des témoins positifs et négatifs conformes, la PCR était considérée comme potentiellement positive et nous avons donc réalisé le séquençage de ces produits de PCR. Après analyse des résultats et bibliographie, nous avons décidé de considérer uniquement les bandes de taille supérieure à 300 pb comme des fragments d'ADN fongique amplifiés. On a donc défini comme « PCR positive » les amplifications donnant une bande de taille supérieure à 300 pb à l'électrophorèse en gel d'agarose (Figure 33). Nous en avons obtenu 57, soit 12,2 % des biopsies gastriques.

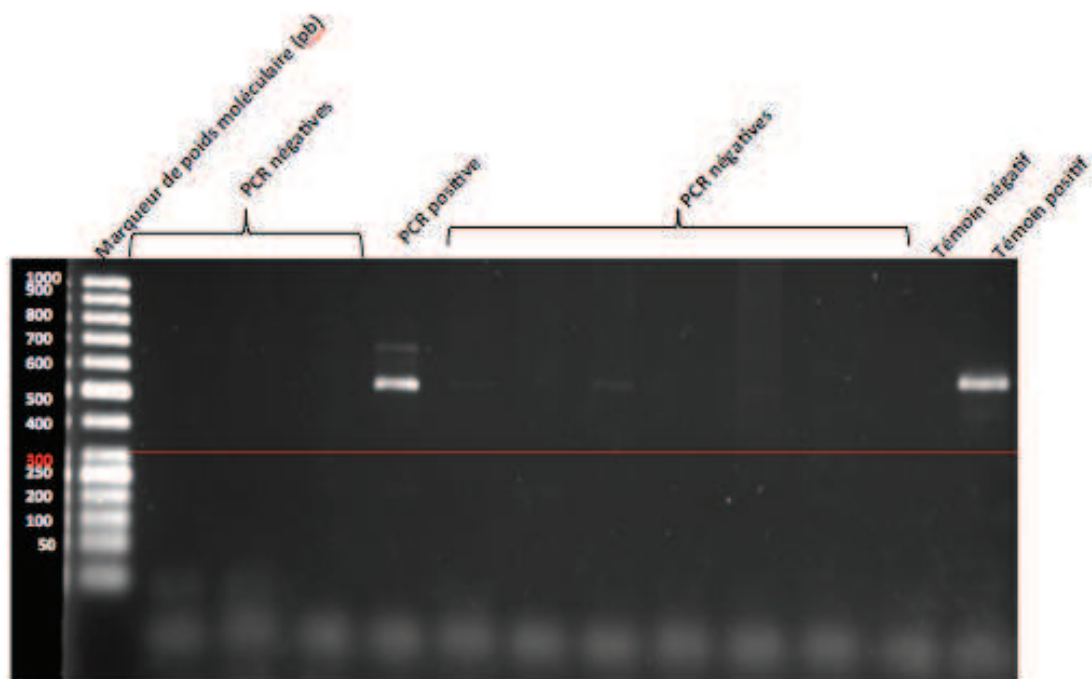


Figure 33 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés à partir des biopsies gastriques : la présence d'une bande de taille équivalente à 500 pb témoigne de la présence de fragments d'ADN amplifiés dans cet échantillon.

Les « PCR douteuses » sont les amplifications donnant des bandes de tailles inférieures à 300 pb à l'électrophorèse en gel d'agarose et représentent 15 des biopsies gastriques, soit 3,2 % (Figure 34).

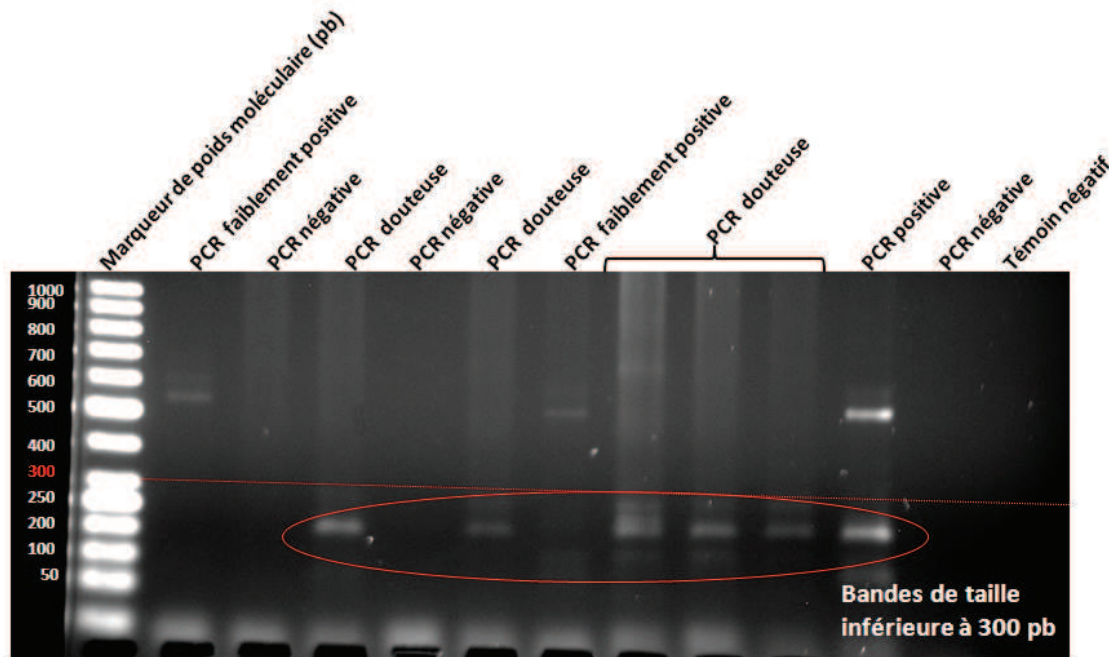


Figure 34 : Gel d'électrophorèse des fragments amplifiés à partir des biopsies gastriques : présence de nombreuses bandes de taille équivalente à 200 pb témoignant de la présence de courts fragments d'ADN amplifiés dans ces échantillons.

3. Analyse des résultats de séquençage

L'analyse des séquences nucléotidiques brutes obtenues par séquençage a été réalisée avec les logiciels Sequencing Analysis et BioEdit Sequence Alignment Editor.

Parmi les 72 résultats de séquençage analysés, 24 présentaient des séquences brutes sens (obtenues avec l'amorce ITS1) et antisens (obtenues avec l'amorce ITS4) exploitables (« ITS1&4 » dans le tableau 4). Dans ces cas, chaque électrophorégramme montrait une seule séquence de bonne qualité et il y avait un alignement parfait entre les deux séquences brutes (Figure 35). Après correction des bases incertaines (mismatches) de la séquence nucléotidique brute à l'aide de la

séquence complémentaire et des électrophorégrammes, nous avons obtenu la séquence consensus par alignement des deux séquences sens et antisens.



Figure 35 : Séquences nucléotidiques brutes et leurs électrophorégrammes obtenus à partir d'une biopsie gastrique : résultat exploitable avec alignement optimal des deux séquences et des électrophorégrammes à séquence unique.

Pour 23 autres résultats de séquençage, la séquence brute sens n'a pas pu être obtenue avec l'amorce ITS1. Seule la séquence brute antisens obtenue avec l'amorce ITS4 était exploitable avec un électrophorégramme montrant une seule séquence de bonne qualité (Figure 36).

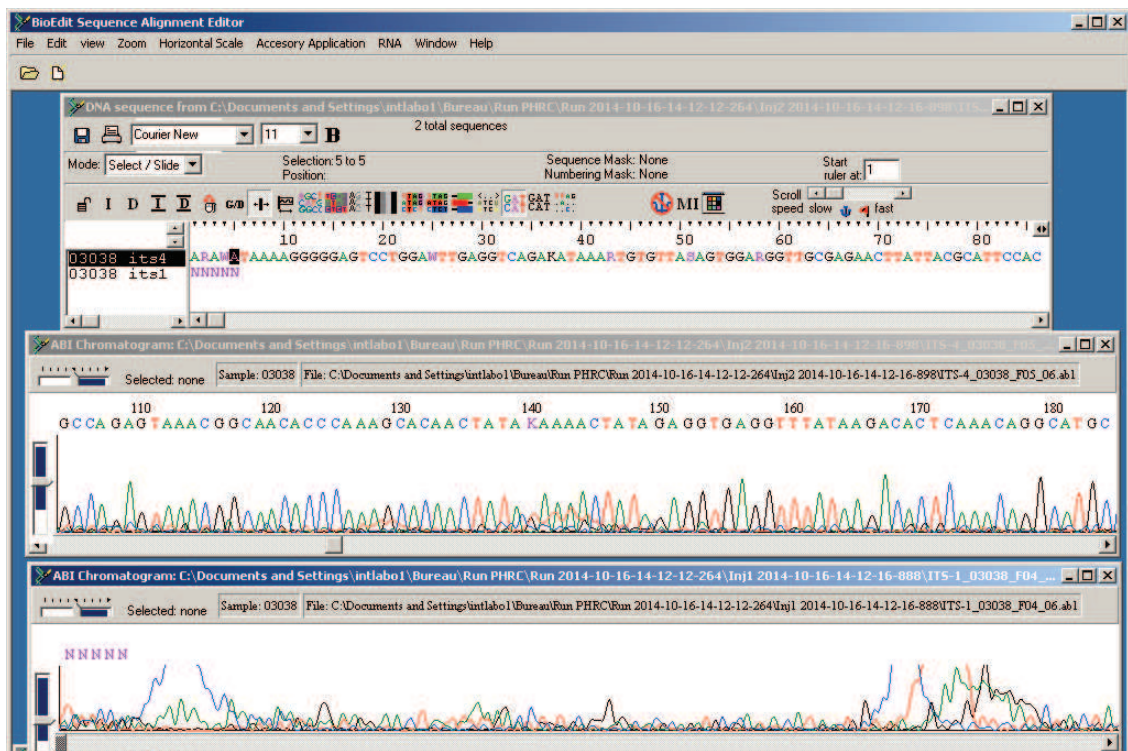


Figure 36 : Séquences nucléotidiques brutes et leurs électrophorégrammes obtenues à partir d'une biopsie gastrique : résultat exploitable pour la séquence obtenue avec l'amorce ITS4 mais inexploitable pour celle avec l'amorce ITS1.

La correction des bases incertaines (mismatches) de cette séquence brute antisens a été faite à l'aide de son électrophorégramme. Cependant, le début de l'électrophorégramme est souvent inexploitable (perte de résolution) et en l'absence de séquence sens complémentaire, il n'est pas possible de la corriger (Figure 37). Nous avons donc décidé de tronquer ce début de séquence afin de conserver une séquence « sûre » même si elle est plus courte. La séquence consensus a été obtenue en utilisant la fonction « reverse complement » sur cette séquence antisens corrigée.

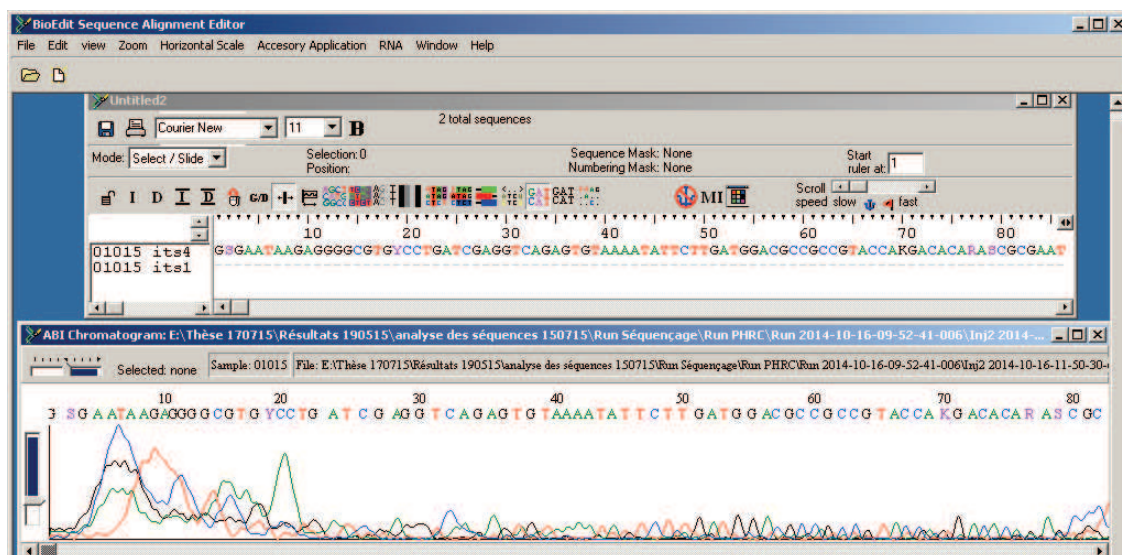


Figure 37 : Séquence nucléotidique brute et son électrophorégramme obtenue à partir d'une biopsie gastrique : perte de résolution en début de séquence la rendant inexploitable sur les 24 premières bases.

Pour les 25 derniers résultats de séquençage, les séquences brutes sens et antisens obtenues avec les amorces ITS1 et ITS4 étaient toutes les deux inexploitables (Figure 38). Les électrophorégrammes montraient plusieurs séquences superposées empêchant le déchiffrement d'une séquence en particulier (« multi-séquence » dans le tableau 4). Il a donc été impossible d'obtenir une séquence consensus. Le séquençage a donc été considéré comme inexploitable.

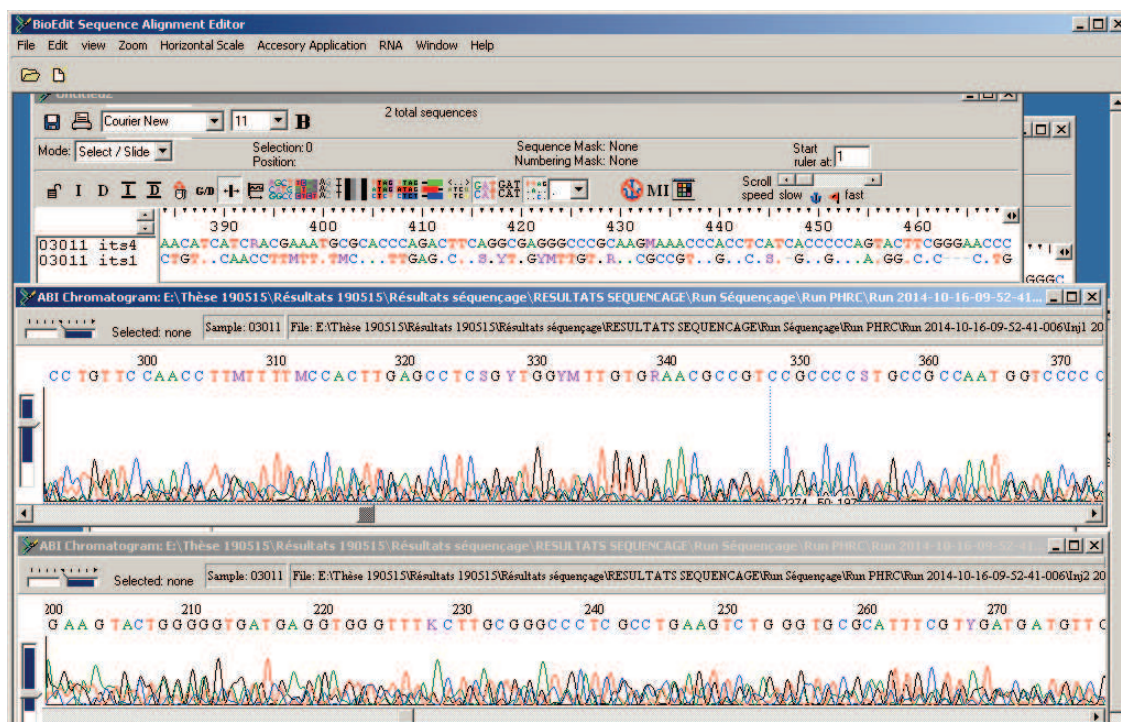


Figure 38 : Séquences nucléotidiques brutes et leurs électrophorégrammes obtenues à partir d'une biopsie gastrique : résultat inexploitable pour les deux séquences avec des électrophorégrammes à séquences multiples indéchiffrables.

Pour les 47 résultats de séquençage exploitables, les séquences consensus obtenues ont ensuite été comparées avec des séquences de référence à l'aide du programme d'alignement BLAST en utilisant plusieurs bases de données disponibles sur internet : NCBI, Mycobank, Unite, DDJB-NIG, BioloMICS, Silva, EMBL-EBI.

Parmi eux, les 10 résultats de séquençage exploitables obtenus à partir de PCR douteuses se sont alignés avec des séquences de référence d'ADN génomique humain du chromosome 21q « *Homo sapiens* ». Il s'agissait de courts fragments d'ADN de taille inférieure à 251 pb (Figure 39).

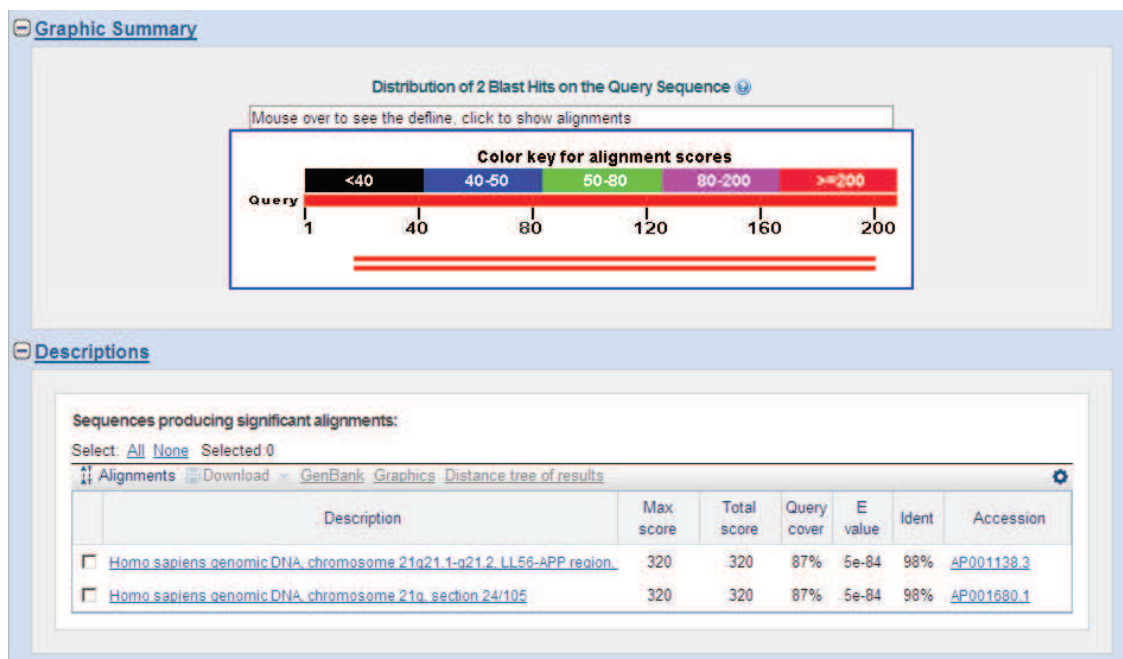


Figure 39 : Résultats de l'alignement des courtes séquences obtenues par séquençage des fragments amplifiés de taille inférieure à 300 pb avec des séquences de références de la base de donnée NCBI (Genbank) : identification d'ADN génomique humain.

Parmi les 37 résultats de séquençage exploitables obtenus à partir de fragments amplifiés de taille supérieure ou égale à 300 pb, deux n'ont donné aucun résultat et un s'est aligné avec une séquence de référence végétal : *Cucurbita sp.* Les 34 autres séquences consensus de taille supérieure à 300 pb se sont alignées significativement avec des séquences de référence fongique. Nous avons considéré comme significatif les alignements comprenant des pourcentages de recouvrement et de similarité supérieurs à 90%. En cas de doute sur l'espèce, lorsque le programme d'alignement BLAST propose différentes espèces avec le même score, nous avons choisi de nous limiter au genre, ce qui a été le cas pour 17 des biopsies gastriques.

4. Synthèse des résultats obtenus

Les résultats de l'étude des 466 biopsies gastriques sont résumés dans la figure 40.

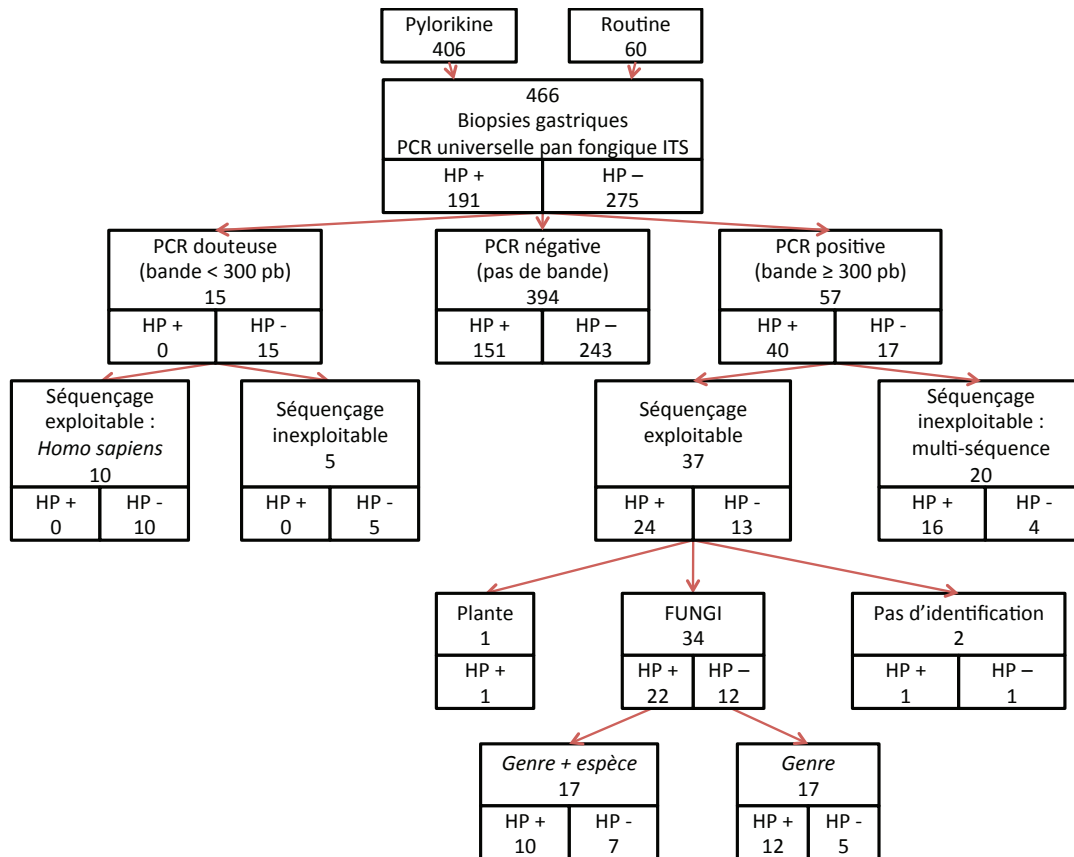


Figure 40 : Diagramme de flux.

Dans cette étude portant sur les biopsies gastriques de 466 patients, 394 soit 84,5% se sont révélées négatives à la PCR ITS. Parmi ces patients, 151, soit 38,3%, étaient infectées par la bactérie *H. pylori*.

Quinze biopsies gastriques, soit 3,2% se sont révélées douteuses à la PCR ITS avec des fragments de taille inférieure à 300 pb. Aucune d'entre elles n'étaient infectées par *H. pylori*. Lors du séquençage des fragments amplifiés, sur 10 des 15 biopsies gastriques, les amorces ITS1 et ITS4 ont accrochées l'ADN génomique humain. Les 5 autres biopsies gastriques ont donné des résultats de séquençage inexploitable.

Les 57 biopsies gastriques restantes, soit 12,2% se sont révélées positives à la PCR ITS avec des fragments de taille supérieure ou égale à 300 pb. Plus d'un tiers de ces biopsies gastriques, soit 70,2%, étaient également infectées par la bactérie *H. pylori*. Seules 37 de ces 57 biopsies gastriques positives à la PCR ITS, soit 64,9%,

avaient des résultats de séquençage exploitables. Vingt-quatre d'entre elles, soit 64,9%, étaient également infectées par la bactérie *H. pylori*. Pour les autres biopsies gastriques, la présence de doubles séquences à l'électrophorégramme rendait le séquençage inexploitable. Parmi les résultats de séquençage exploitables, 34 se sont alignées significativement avec des séquences de référence fongiques, ce qui représente 7,3 % de la totalité des biopsies gastriques analysées. La moitié de ces biopsies gastriques a pu être reliée à un genre et à une espèce bien définie et l'autre moitié seulement à un genre (doute sur l'espèce). Un des résultats de séquençage exploitables s'est aligné significativement avec une séquence de référence végétale (*Cucurbita sp*) et deux autres ne se sont alignés avec aucune séquence de référence quelque soit la base de données utilisée.

5. Résultat des identifications moléculaires par séquençage

Les résultats des 72 séquençages réalisés à partir des biopsies gastriques positives ou douteuses à l'amplification génique ITS sont présentés dans le tableau 4.

Résultat de séquençage : identification de l'ADN fongique	Recouvrement / similarité de l'alignement (%)	Résultat de la PCR ITS	Taille du fragment d'ADN fongique (pb)	Séquences brutes obtenues par séquençage	Infection par <i>H. pylori</i>	Histologie gastrique	Sexe	Age	Pays de naissance
<i>Candida albicans</i>	99/100	Positive	507	ITS1&4	NEG	Muqueuse normale	M	61	France
<i>Candida albicans</i>	100/97	Positive	518	ITS4 seule	NEG	Ulcère gastrique	F	77	France
<i>Candida albicans</i>	99/99	Positive	508	ITS4 seule	NEG	Gastrite	M	72	France
<i>Candida tropicalis</i>	97/99	Positive	510	ITS1&4	NEG	Ulcère duodénal	M	71	France
<i>Sporobolomyces roseus</i>	100/99	Positive	570	ITS1&4	NEG	Muqueuse normale	F	47	Algérie
<i>Sporobolomyces roseus</i>	99/99	Positive	583	ITS1&4	POS	Gastrite	M	42	Russie
<i>Sporobolomyces riberrimus</i>	100/95	Positive	510	ITS4 seule	POS	Gastrite	M	46	Royaume uni
<i>Rhodotorula glutinis</i>	99/97	Positive	575	ITS4 seule	POS	Ulcère duodénal	M	21	Cameroun
<i>Rhodotorula glutinis</i>	99/99	Positive	577	ITS4 seule	POS	Gastrite	M	66	France
<i>Dioszegia hungarica</i>	98/99	Positive	473	ITS1&4	POS	Dysplasie	F	84	France
<i>Dioszegia crocea</i>	99/99	Positive	457	ITS4 seule	POS	Gastrite	F	76	France
<i>Bulleromyces albus</i>	99/99	Positive	524	ITS1&4	POS	Gastrite	M	40	France
<i>Guehomyces pullulans</i>	99/100	Positive	599	ITS1&4	POS	Gastrite	F	49	France
<i>Psathyrella candolleans</i>	99/98	Positive	681	ITS4 seule	POS	Atrophie	M	41	Sénégal
<i>Schizopora radula</i>	98/97	Positive	600	ITS4 seule	POS	Gastrite	M	42	Mali
<i>Leptosphaerulina chartarum</i>	99/97	Positive	581	ITS4 seule	NEG	Gastrite	M	78	France
<i>Neoeversiphe galii</i>	100/99	Positive	565	ITS4 seule	NEG	Gastrite	F	50	France
<i>Cladosporium sp</i>	99/92	Positive	527	ITS1&4	POS	Métaplasie	F	62	France
<i>Cladosporium sp</i>	100/99	Positive	525	ITS1&4	POS	Gastrite	M	49	Algérie
<i>Cladosporium sp</i>	100/100	Positive	527	ITS1&4	POS	Gastrite	M	30	Azerbaïdjan
<i>Cladosporium sp</i>	100/98	Positive	527	ITS4 seule	NEG	Gastrite	M	47	France
<i>Cladosporium sp</i>	100/95	Positive	589	ITS4 seule	NEG	Gastrite	M	68	France
<i>Cladosporium sp</i>	100/95	Positive	501	ITS4 seule	POS	Métaplasie	M	74	France
<i>Cladosporium sp</i>	96/90	Positive	520	ITS4 seule	POS	Gastrite	F	35	France
<i>Cladosporium sp</i>	100/95	Positive	527	ITS1&4	POS	Atrophie	M	50	Algérie
<i>Peniophora sp</i>	99/90	Positive	614	ITS4 seule	POS	Gastrite	F	72	France
<i>Peniophora sp</i>	97/93	Positive	611	ITS1&4	POS	Atrophie	M	38	Algérie
<i>Curvularia sp</i>	97/99	Positive	548	ITS1&4	POS	Gastrite	F	51	France
<i>Ascochyta sp</i>	96/99	Positive	522	ITS1&4	POS	Atrophie	M	28	Togo
<i>Peyronellaea sp</i>	99/99	Positive	517	ITS4 seule	POS	Gastrite	M	71	France
<i>Udeniomyces sp</i>	99/93	Positive	661	ITS4 seule	POS	Atrophie	M	60	Ghana
<i>Hyphodontia sp</i>	98/96	Positive	631	ITS4 seule	NEG	Muqueuse subnormale	F	49	France
<i>Botrytis sp</i>	100/99	Positive	514	ITS4 seule	NEG	Dysplasie	F	57	France
<i>Tulasnella sp</i>	97/96	Positive	579	ITS1&4	NEG	Ulcère gastrique	F	54	France
<i>Cucurbitasp (végétal)</i>	96/94	Positive	669	ITS1&4	POS	Atrophie	M	26	France
Pas d'identification		Positive	618	ITS1&4	POS	Gastrite	M	25	Maroc
Pas d'identification		Positive	423	ITS4 seule	NEG	Gastrite	M	35	France
Pas d'identification		Positive	424	Multi-séquence	POS	Gastrite	M	59	Maroc
Pas d'identification		Positive	576	Multi-séquence	POS	Ulcère duodénal	M	71	France
Pas d'identification		Positive	547	Multi-séquence	POS	Gastrite	F	55	France
Pas d'identification		Positive	621	Multi-séquence	POS	Métaplasie	M	88	France
Pas d'identification		Positive	431	Multi-séquence	POS	Atrophie	M	37	Sénégal
Pas d'identification		Positive	612	Multi-séquence	POS	Ulcère gastrique	F	29	France
Pas d'identification		Positive	605	Multi-séquence	POS	Gastrite	F	52	France
Pas d'identification		Positive	650	Multi-séquence	POS	Gastrite	M	39	Tunisie
Pas d'identification		Positive	599	Multi-séquence	POS	Gastrite	M	55	France
Pas d'identification		Positive	613	Multi-séquence	POS	Ulcère gastrique	M	62	Algérie
Pas d'identification		Positive	656	Multi-séquence	POS	Atrophie	F	89	France
Pas d'identification		Positive	610	Multi-séquence	POS	Métaplasie	M	59	Portugal
Pas d'identification		Positive	639	Multi-séquence	POS	Ulcère gastrique	M	30	Soudan
Pas d'identification		Positive	612	Multi-séquence	POS	Cancer	M	92	France
Pas d'identification		Positive	353	Multi-séquence	POS	Gastrite	F	32	Sénégal
Pas d'identification		Positive	700	Multi-séquence	POS	Métaplasie	F	78	France
Pas d'identification		Positive	606	Multi-séquence	NEG	Muqueuse subnormale	M	44	France
Pas d'identification		Positive	601	Multi-séquence	NEG	Muqueuse normale	F	75	France
Pas d'identification		Positive	648	Multi-séquence	NEG	Muqueuse normale	F	38	France
Pas d'identification		Positive	300	Multi-séquence	NEG	Atrophie	F	56	France
Homo sapiens ADN génomique chromosome 21q		Douteuse	180	ITS1&4	NEG	Muqueuse subnormale	M	41	France
Homo sapiens ADN génomique chromosome 21q		Douteuse	174	ITS1&4	NEG	Muqueuse subnormale	M	45	France
Homo sapiens ADN génomique chromosome 21q		Douteuse	172	ITS4 seule	NEG	Métaplasie	M	48	France
Homo sapiens ADN génomique chromosome 21q		Douteuse	220	ITS4 seule	NEG	Atrophie	M	86	France
Homo sapiens ADN génomique chromosome 21q		Douteuse	169	ITS1&4	NEG	Muqueuse subnormale	F	54	France
Homo sapiens ADN génomique chromosome 21q		Douteuse	251	ITS4 seule	NEG	Muqueuse subnormale	F	74	France
Homo sapiens ADN génomique chromosome 21q		Douteuse	175	ITS1&4	NEG	Gastrite	F	58	Algérie
Homo sapiens ADN génomique chromosome 21q		Douteuse	172	ITS1&4	NEG	Muqueuse subnormale	M	43	France
Homo sapiens ADN génomique chromosome 21q		Douteuse	173	ITS1&4	NEG	Gastrite	M	50	France
Homo sapiens ADN génomique chromosome 21q		Douteuse	175	ITS1&4	NEG	Atrophie	M	94	France
Pas d'identification		Douteuse	75	Inexploitable	NEG	Ulcère duodénal	F	54	France
Pas d'identification		Douteuse	77	Inexploitable	NEG	Muqueuse normale	F	81	France
Pas d'identification		Douteuse	131	Inexploitable	NEG	Gastrite	F	47	France
Pas d'identification		Douteuse	134	Inexploitable	NEG	Gastrite	M	62	France
Pas d'identification		Douteuse	240	Inexploitable	NEG	Gastrite	M	50	France

Tableau 4 : Présentation des résultats des 72 séquençages réalisés à partir des biopsies gastriques.

6. Espèces fongiques identifiées

Les genres et espèces des champignons identifiés par séquençage ITS dans les biopsies gastriques sont représentés dans la figure 41 au sein de la classification fongique.

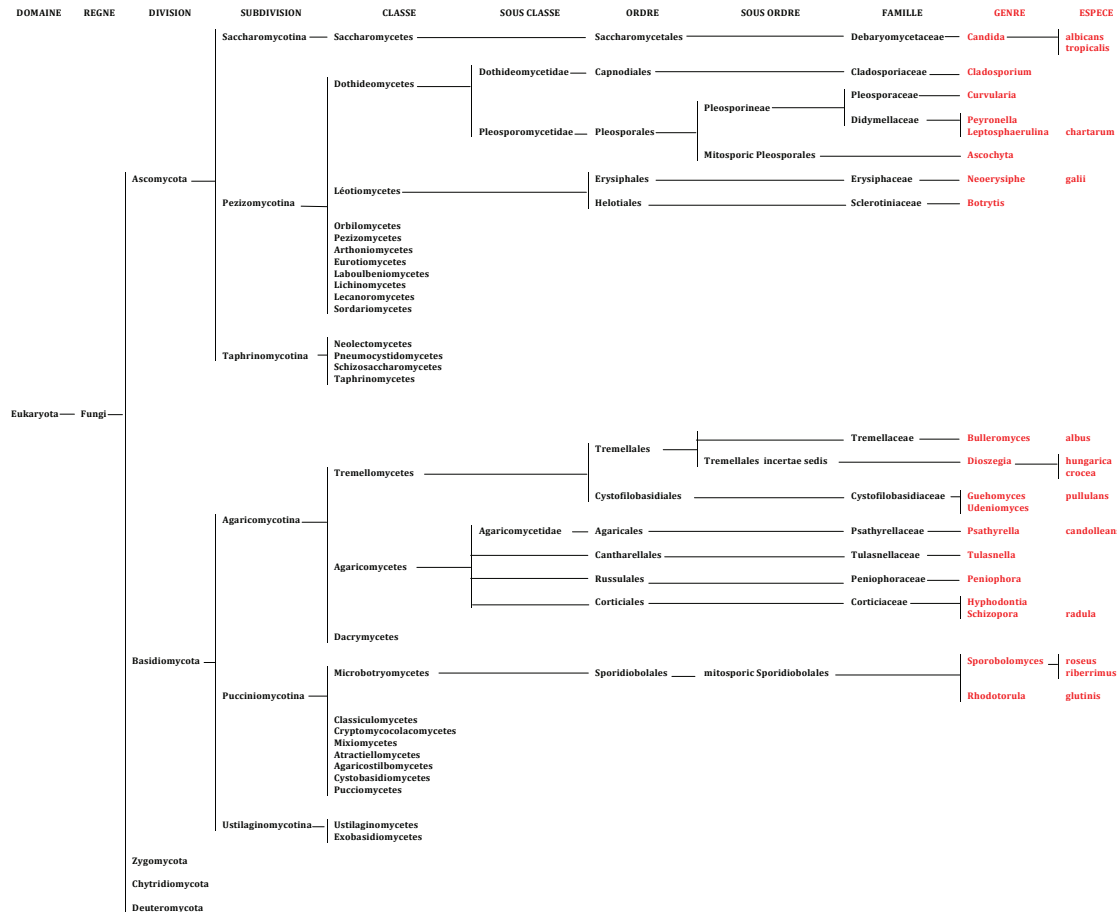


Figure 41 : Genres et espèces des champignons identifiés (en rouge) au sein de la classification fongique.

Seules deux des cinq divisions fongiques (*Ascomycota* et *Basidiomycota*) sont représentées dans les espèces identifiées chez nos patients. Parmi les espèces fongiques identifiées, seuls deux genres sont potentiellement pathogènes : *Candida* et *Cladosporium*.

7. Analyse statistique

Nous avons voulu étudier le lien entre la présence d'ADN fongique et l'infection par la bactérie *H. pylori* au niveau gastrique. Nous avons donc comparé la population des patients possédant de l'ADN présumé fongique au niveau gastrique (PCR ITS positives) à la population des patients sans ADN fongique (PCR ITS négatives et douteuses).

On peut observer que les patients chez lesquels on a détecté la présence d'ADN présumé fongique sont plus souvent infectés par la bactérie *H. pylori* que les patients sans ADN fongique (36,92% vs 70,17% ; $p = 1,7 \cdot 10^{-6}$). De même, ils présentent plus souvent une histologie gastrique inflammatoire (71,88% vs 84,21% ; $p = 0,048$). Il y a également une disparité du pays de naissance entre les deux populations : on observe chez les patients possédant de l'ADN présumé fongique au niveau gastrique plus de personnes dont la France est le pays de naissance (20,11% vs 37,74% ; $p = 0,004$). Nous n'avons cependant pas observé de différence de répartition du sexe ($p=0,07$) et de l'âge ($p=0,13$) entre les deux populations ni de différence significative de l'âge moyen ($p = 1,19$).

Parmi les patients chez qui nous avons détecté de l'ADN présumé fongique au niveau gastrique (PCR ITS positives), 20 présentaient des résultats de séquençage inexploitable, du fait de la présence de plusieurs séquences superposées sur l'électrophorégramme. Nous avons voulu comparer ces 20 patients ayant de multiples séquences avec les 37 patients dont les résultats de séquençage exploitables avec une séquence unique ont permis une identification fongique. Les caractères que nous avons étudié se répartissent de façon identique dans les deux populations étudiées : sexe ($p = 0,47$), âge ($p=0,32$), pays de naissance ($p = 0,75$), infection par la bactérie *H. pylori* ($p= 0,23$) et histologie gastrique ($p= 0,5$).

L'étude de la population de patients infectés par la bactérie *H. pylori* a montré que la présence d'ADN fongique n'est pas liée à une expression clinique plus sévère de l'infection à *H. pylori* ($p=0,24$) : ulcères gastrique et duodéal, atrophie, métaplasie, dysplasie et cancer. Nous avons également constaté que cette présence d'ADN fongique n'est pas non plus liée à un état d'hypochlorhydrie secondaire aux lésions inflammatoires provoquées par la bactérie *H. pylori* : atrophie, métaplasie, dysplasie et cancer ($p=0,27$).

VI. DISCUSSION

Pour la recherche et la description du mycobiome gastrique, nous avons étudié les biopsies gastriques de 466 patients infectés ou non par la bactérie *H. pylori* et présentant différentes pathologies gastro-duodénales pouvant être causées par cette infection pro-inflammatoire. Pour ce travail, nous avons besoin d'une technique de détection de l'ADN fongique et d'identification des champignons précise et efficace, sans culture préalable, sur des échantillons tels que les extraits des biopsies gastriques que nous voulions étudier.

A. Mise au point de la technique d'identification moléculaire fongique

La description du mycobiome gastrique a nécessité la mise au point d'une technique d'identification des champignons précise et efficace dans des échantillons biologiques sans culture préalable. Nous avons choisi la technique d'identification moléculaire fongique par amplification génique et séquençage Sanger avec le couple d'amorces universelles pan fongiques ITS1 et ITS4.

S'il s'agit déjà de la méthode d'identification moléculaire standard la plus utilisée pour les études d'écologie et de taxonomie moléculaire des espèces fongiques [31], les vérifications auxquelles nous avons procédé lors de la mise au point ont confirmé la performance de cette technique. Nous avons testé cette technique sur une large gamme de champignons aussi bien retrouvés en pathologie humaine qu'en hygiène hospitalière et étude environnementale, tel que *Candida albicans* et *Candida inconspicua* ; *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus flavus* et *Aspergillus terreus*; *Fusarium oxysporum*, *Trichophyton rubrum*, *Fonsecaea nubica*, *Altenaria sp*, *Scedosporium apiospermum*, *Cladosporium sp*, *Penicillium expansum*, *Scopulopsis sp* et *Kazachstania heterogenica*. Seules les identifications moléculaires de deux espèces d'*Aspergillus* (*niger* et *nidulans*) ont rencontré des difficultés, sûrement dues à un problème d'extraction. Nous avons également testé cette technique avec différentes méthodes d'extraction : thermique « boiling/freezing » et « boiling » seul, manuelle avec le kit Qiagen et automatisée

avec l'automate Roche. Après adaptation de la prise d'essai, nous avons observé la même performance quelque soit la méthode d'extraction utilisée. Pour finir, nous avons pu valider notre méthode sur différents types d'échantillons : cultures fongiques et biopsies (sinusale, vulvaire et gastriques).

L'électrophorèse en gel d'agarose a permis de vérifier la présence, la taille et la pureté des fragments d'ADN amplifiés grâce à la visualisation sous lumière UV. La réussite de l'amplification génique a été contrôlée à l'aide de témoins sur chaque série d'amplification. Pendant la mise au point puis lors du passage des 466 biopsies, les témoins d'amplification ont toujours été conformes. Pourtant, comme le montre l'étude de Loeffler *et al.* [88], le risque de contamination des séries d'amplification par les autres produits d'amplification générés dans le laboratoire mais également par les moisissures aéroportées de l'environnement est important (8 % de réactions positives pour les témoins négatifs). Cependant aucune contamination fongique des réactions d'amplification n'a été observée lors de notre étude (absence d'ADN amplifié pour les témoins négatifs). De même, la réussite de l'amplification génique a toujours été confirmée par les témoins positifs. Ces résultats confirment la performance de la technique d'amplification génique fongique avec les amorces universelles pan fongiques ITS1 et ITS4.

En ce qui concerne le séquençage, l'amorce sens ITS1 n'a pas permis l'obtention d'une séquence nucléotidique dans 23 des 72 séquençages réalisés (soit 32%) et seule l'amorce antisens ITS4 produisait une séquence nucléotidique exploitable. Le traitement des séquences nucléotidiques brutes obtenues par séquençage de ces produits d'amplification a été facilité par l'utilisation de logiciels tels que Sequencing Analysis et BioEdit Sequence Alignment Editor. Pour l'identification des séquences d'ADN fongique à l'aide du programme d'alignement BLAST, plusieurs bases de données sont disponibles gratuitement sur internet : NCBI, Mycobank, Unite, DDJB-NIG, BioloMICS, Silva, EMBL-EBI [35, 71, 72, 73]. Ces bases de données de séquences fongiques de référence sont encore incomparablement moins riches que celles référençant l'ADNr 16S pour les séquences bactériennes, limitant la capacité à classer les séquences d'ADNr fongique au niveau de l'espèce. De plus, la taxonomie fongique est complexe et ne cesse d'évoluer, ce qui génère la présence de nombreux synonymes taxonomiques et favorise les erreurs

de classification. Ainsi, certaines formes sexuées ou asexuées d'une même espèce de champignons peuvent être affiliées à des taxons différents [27].

B. Étude des biopsies gastriques

Une fois la technique d'identification moléculaire fongique mise au point, nous avons pu réaliser l'étude de 466 biopsies gastriques. Le premier résultat notable de cette étude était le faible nombre de biopsies gastriques dans lesquels nous avons détecté de l'ADN par amplification génique ITS : seules 57 des 466 biopsies gastriques, soit 12,2 %, se sont révélées positives avec des fragments amplifiés de taille supérieure à 300 pb. Pour 35 de ces biopsies positives, l'identification moléculaire des amplifiats a été une réussite avec l'identification du genre fongique et a même permis d'accéder à l'espèce fongique dans 17 de ces biopsies. Cependant, l'une de ces identification d'amplifiat a révélé un végétal : *Cucurbita sp.* La taille du fragment d'ADN amplifié (669 pb), la bonne lisibilité des deux électrophorégrammes obtenus par séquençage et les hauts pourcentages de recouvrement et de similarité de l'identification moléculaire par alignement (96 et 94 %) confirment la véracité de ce surprenant résultat. Cela montre l'un des défauts de ce couple d'amorces universelles ITS1 / ITS4 qui est le manque de spécificité. Ce manque de spécificité peut être corrigé par l'utilisation d'amorces plus spécifiques permettant une amplification sélective de séquences fongiques comme ITS1F par exemple [81]. Cependant, il ne s'agit que d'un cas isolé, les 34 autres identifications moléculaires ayant permis l'identification de genres et d'espèces appartenant au règne fongique. Pour deux des 57 biopsies gastriques positives en amplification génique ITS, l'ADN amplifié n'a pas pu être identifié dans aucune des 7 bases de données consultées, malgré la réussite du séquençage avec des fragments d'ADN amplifié de taille égale à 423 et 618 pb et des électrophorégrammes de séquençage exploitables (l'un avec les deux amorces ITS1 et ITS4 et l'autre avec ITS4 seule). Ces deux séquences d'ADN ne sont donc pas renseignées dans les bases de données consultées. Peut être s'agit-il de nouvelles espèces fongiques pas encore décrites au niveau moléculaire.

Pour les 20 dernières de ces 57 biopsies gastriques positives en amplification génique ITS, soit 35%, l'ADN amplifié n'a pas pu être identifié. Cela était dû à la présence de multiples séquences superposées sur les électrophorégrammes de séquençage, empêchant le déchiffrement de chaque séquence d'ADN fongique et de ce fait, l'identification de chacune d'entre elle. Dans ces cas, le séquençage est considéré comme inexploitable mais il laisse présumer de la présence d'un ou plusieurs ADN très certainement d'origine fongique. Ainsi nous avons fait le choix de considérer ces vingt patients comme hébergeant des champignons au niveau gastrique pour la réalisation de nos études statistiques. Nous avons également vérifié qu'aucun caractère démographique ou clinique des patients ne pouvait influencer le séquençage et expliquer la présence de multiples séquences d'ADN sur les électrophorégrammes de séquençage. Ainsi le sexe ($p=0,47$), l'âge ($p=0,32$), le pays de naissance ($p=0,75$), l'infection par la bactérie *H. pylori* ($p=0,23$) et l'histologie gastrique ($p=0,5$) se répartissent de façon identique dans la population de patients à séquence unique et ceux présentant des séquences multiples. Ils représentent donc une population homogène, population considérée comme hébergeant un ou plusieurs champignons au niveau gastrique.

Pour confirmer la présence de champignons au niveau de l'estomac de ces patients à séquences multiples, il faudrait utiliser d'autres techniques moléculaires permettant de séparer ces séquences multiples afin d'identifier chacune d'entre elles. De plus la quantification de ces champignons pourrait apporter de précieuses informations sur le compartiment gastrique et son éventuel mycobiome. D'autant plus que pour les biopsies gastriques dans lesquelles un seul champignon a été identifié, il pourrait s'agir du champignon majoritaire dont la prédominance masque la présence d'autres champignons minoritaires non détectés par notre étude. Les techniques de séquençage haut débit tel que le pyroséquençage apporterait donc un approfondissement de l'étude de nos biopsies positives à l'amplification génique ITS. Cependant, ces techniques de séquençage haut débit ont un coût élevé et le principal problème réside dans l'analyse bio-informatique du très grand nombre de séquences générées [25, 29, 30].

Les 15 résultats d'amplification génique ITS douteux, présentant des fragments d'ADN de taille inférieure à 300 pb, ont été contrôlés par séquençage. Cinq d'entre eux se sont révélés négatifs au séquençage tandis que pour les 10 autres, les séquences amplifiées correspondaient à de l'ADN génomique humain (le chromosome 21 q). On retrouve ainsi le problème de non spécificité de ce couple d'amorces universelles ITS1/ ITS4. En effet, si l'espaceur ITS conjointement amplifié avec le gène 5,8s est un bon marqueur spécifique permettant l'identification du genre voire même de l'espèce, il est tellement conservé qu'il est capable avec des amorces non spécifiques tel que ce couple ITS1/ITS4 de s'hybrider à de l'ADN d'origine végétal mais aussi à de l'ADN humain, ce qui pose problème avec les échantillons d'origine humaine comme dans notre cas [78].

C. Influence de la bactérie *H. pylori*

La connaissance du statut infectieux à *H. pylori*, de l'histologie gastrique ainsi que d'autres facteurs démographiques tels que le sexe, l'âge et le pays de naissance nous ont permis d'étudier la population de nos 466 patients.

La population étudiée était infectée par *H. pylori* avec une prévalence de 41%, ce qui est proche de la prévalence de la population générale du même âge en pays développé [93]. Nous avons mis en évidence une influence forte de l'infection par la bactérie *H. pylori* sur la présence d'ADN fongique gastrique. En effet, les patients chez lesquels on a détecté la présence d'ADN présumé fongique sont plus souvent infectés par la bactérie *H. pylori* ($p=1,7.10^{-6}$). Nous avons également un lien entre la présence d'inflammation de la muqueuse gastrique (ulcère gastrique, gastrite, atrophie, métaplasie, dysplasie et cancer) et la présence d'ADN fongique ($p=0,048$), mais ce lien est vraisemblablement dû à la présence d' *H. pylori*, bactérie pro-inflammatoire [91, 92, 96]. Pour finir, nous montrons un lien entre une naissance à l'étranger et la présence d'ADN fongique au niveau gastrique. Cependant il faut noter que la prévalence de l'infection à *H. pylori* dans les pays dont nos patients sont d'origine, est bien supérieure à celle de la France [93]. Ainsi ce lien est peut être dû lui aussi à la présence d'*H. pylori*. Le sexe ($p=0,07$) et l'âge ($p=0,13$) des

patients ne semblent cependant pas être un facteur d'influence pour la présence d'ADN fongique au niveau gastrique.

Par ailleurs, nous avons voulu étudier l'influence de la présence d'ADN fongique au niveau de la muqueuse gastrique sur le déterminisme pathologique de l'infection à *H. pylori*. En effet, les champignons et certains profils de mycobiome apparaissent désormais impliqués comme cofacteurs potentiels dans la physiopathologie de plusieurs maladies [31]. L'étude qui nous a inspiré en particulier est celle de Flahou *et al.* [44] sur les gerbilles de Mongolie qui montre qu'une levure, *Kazachstania heterogenica*, colonise l'estomac exactement dans les mêmes régions que la bactérie *Helicobacter suis* et conduit à une augmentation significative de l'inflammation gastrique causée par *Helicobacter* dans ce modèle animal. En nous focalisant sur la population de patients infectés par la bactérie *H. pylori*, nous nous sommes intéressé à l'expression clinique (histologie gastrique) de cette infection en fonction de la présence ou non d'ADN fongique dans la muqueuse gastrique. Cependant la présence d'ADN fongique n'est pas liée à une expression clinique plus sévère de l'infection à *H. pylori* ($p=0,24$), ce qui démontre qu'elle ne potentialise pas l'effet pathogène de la bactérie *H. pylori* dans notre cas. Ainsi la présence fongique n'est donc pas un cofacteur de gravité de l'infection à *H. pylori*, responsable d'une évolution vers des pathologies sévères : ulcères ou cancers.

En conclusion le lien entre la présence de la bactérie *H. pylori* et de champignons au niveau gastrique peut être établi et les autres liens démontrés semblent découler de cette infection par la bactérie *H. pylori*. Cependant la présence d'ADN fongique dans la muqueuse gastrique des patients infectés par *H. pylori* ne constitue pas un cofacteur de gravité de l'expression clinique de cette infection.

D. Genres fongiques identifiés

Parmi les genres fongiques identifiés par séquençage, huit appartenaient à la division des *Ascomycota* et onze à celle des *Basidiomycota*. Dans la division *Ascomycota*, les champignons identifiés appartenaient aux *Saccharomycotina* et aux *Pezizomycotina*. Chez les *Saccharomycotina*, nous avons identifié trois *Candida*

albicans et un *Candida tropicalis*. Seules deux des dix classes des *Pezizomycotina* ont été représentées : les *Dothideomycètes* et les *Léotiomycètes* avec huit champignons du genre *Cladosporium*, un du genre *Curvularia*, un du genre *Peyronella*, un du genre *Ascochyta*, un du genre *Botrytis* ainsi qu'un *Leptosphaerulina chartarum* et un *Néoerysiphe galii*. Dans la division *Basidiomycota*, la subdivision *Agaricomycotina* était fortement représentée avec des espèces appartenant à deux des trois classes : *Tremellomycète* et *Agaricomycète*. On a ainsi pu identifier deux champignons du genre *Dioszegia* (*hungarica* et *crocea*), un *Bulleromyces albus*, un *Guehomyces pullulans*, un *Schizopora radula* et un *Psathyrella candolleans* ainsi qu'un champignon du genre *Udeniomyces*, un du genre *Tulasnella*, deux du genre *Peniophora* et un du genre *Hyphodontia*. On a également identifié quelques *Sporidiobolales* appartenant à la subdivision des *Pucciniomycotina* : trois champignons du genre *Sporobolomyces* (*roseus* et *riberrimus*) et deux *Rhodotorula glutinis*. Aucun champignon appartenant aux divisions *Zygomycota* et *Chytridiomycota* n'a été identifié dans nos biopsies gastriques. Si la division des *Zygomycota* est fréquemment retrouvée chez l'homme avec les *Mucorales* en particulier responsables occasionnellement de mucormycoses chez les patients immunodéprimés [13], la division des *Chytridiomycota* regroupe des champignons primitifs aquatiques rarement décrits chez l'homme.

Si seules deux des cinq divisions fongiques sont représentées, on retrouve quand même une certaine diversité des genres fongiques identifiés. De plus, aucun genre de champignon n'a été majoritairement détecté dans les biopsies gastriques de nos patients. Parmi les espèces fongiques identifiées, seules deux genres sont potentiellement pathogènes : *Candida* et à moindre degré *Cladosporium*. Nous n'avons identifié que 12 patients avec de l'ADN de ces espèces potentiellement pathogènes. Les autres genres sont des saprophytes de végétaux sans potentiel pathogène.

En conclusion, notre étude des 466 biopsies gastriques détecte peu d'ADN fongique au niveau gastrique (12,2%) avec une diversité des genres fongiques identifiés, dispersés au sein de la classification du règne fongique.

E. Mycobiome ou flore de transit ?

La présence de champignons au niveau gastrique peut suivre trois modèles : l'infection, la colonisation ou la flore de transit. L'infection correspond à l'envahissement et la multiplication de micro-organismes pathogènes au sein d'un organe du corps vivant avec une action délétère sur cet organe. La colonisation se caractérise par la présence à long terme de micro-organismes vivants dits « commensaux » composant les différents écosystèmes de l'humain dont les principaux sont la muqueuse orale, la peau, les voies respiratoires et les tractus intestinal et génital [15]. Si la colonisation n'occasionne pas d'effet délétère mais plutôt un effet bénéfique pour l'organisme humain, elle peut tout de même dans certains cas (déséquilibre de l'écosystème, immunodépression) se transformer en relation pathogène opportuniste. La flore de transit correspond à des micro-organismes morts ou vivants, dont la présence transitoire n'entraîne aucun effet sur l'organisme.

L'hypothèse de l'infection gastrique par des champignons semble peu probable en raison de l'absence de pathologies gastriques fongiques décrites à ce jour. Quant à la colonisation de ce compartiment gastrique très particulier, il semblerait étonnant qu'autant de champignons aient les caractéristiques pour survivre et proliférer dans cet environnement acide hostile (pH aux alentours de 5,5) [96]. Parmi les bactéries, *H. pylori* est l'une des seules possédant les deux facteurs nécessaires à la colonisation de l'épithélium gastrique : la mobilité, assurée par ses 5 à 7 flagelles polaires, lui permettant de se déplacer au sein du mucus gastrique et l'uréase, capable de tamponner l'acidité gastrique [97]. Ainsi si un champignon possédait de telles caractéristiques pour coloniser le compartiment gastrique, il serait probablement retrouvé communément dans les biopsies gastriques de nos patients et le pourcentage de biopsies gastriques positives à l'amplification génique ITS serait sûrement plus élevé. Ainsi, le très faible pourcentage de patients présentant de l'ADN fongique au niveau gastrique (12,2%) et la diversité des genres et espèces fongiques détectés ne permet pas d'affirmer la présence d'une flore fongique gastrique résidente de type mycobiome.

La question de la provenance de cet ADN fongique retrouvé au niveau de l'estomac de nos patients se pose. L'hypothèse d'ADN fongique en transit au niveau

gastrique, provenant du bol alimentaire, peut être une explication. En effet les champignons servent dans l'élaboration des nombreux aliments tels que pain, vin, bière, fromage... [12]. Ainsi de nombreuses espèces fongiques environnementales peuvent se retrouver dans notre alimentation. De plus, il faut rester prudent avec l'interprétation de la présence d'ADN dans les échantillons biologiques car en raison de sa persistance, il ne prouve en aucun cas la présence de cellules viables.

Cependant, l'influence de l'infection par la bactérie *H. pylori* sur la présence d'ADN fongique soulève des questions. Cette influence pourrait indiquer la persistance au niveau l'estomac de champignons présents dans le bol alimentaire en présence d'*H. pylori*, sans qu'il soit observé de spécificité de genre fongique ni de synergie de la pathogénicité d'*H. pylori*. De plus, les trois-quarts des patients présentant des séquences multiples au séquençage, pouvant évoquer la présence de plusieurs champignons au niveau gastrique, sont également infectés par *H. pylori* (80%). Cela semble confirmer cette hypothèse.

Pour essayer d'expliquer cette possible persistance de l'ADN fongique au niveau gastrique en présence de la bactérie *H. pylori*, nous avons émis plusieurs hypothèses. Tout d'abord, nous avons analysé l'influence de l'acidité gastrique avec la constitution de deux groupes de patients en s'appuyant sur les études décrivant un état d'hypochlorhydrie secondaire aux lésions inflammatoires provoquées par la bactérie *H. pylori* (atrophie, métaplasie, dysplasie et cancer) [91, 96, 98, 100, 101, 102, 103]. L'hypothèse de travail était que l'état d'hypochlorhydrie rendrait l'environnement gastrique plus hospitalier pour le développement fongique. Cependant l'étude de la répartition des résultats d'amplification génique ITS positifs au sein des deux groupes constitués n'a pas montré de différence significative ($p=0,27$). L'hypothèse d'un défaut d'élimination des restes du bol alimentaire au niveau gastrique en raison de cette inflammation causée par la bactérie *H. pylori*, celle ci permettant à l'ADN fongique de rester accroché à la muqueuse gastrique, reste une hypothèse à confirmer.

Pour conclure, si la description du mycobiome humain évolue avec les études des mycobiomes oral, des voies respiratoires, cutané, intestinal et génital, le

compartiment gastrique ne semble pas contenir de mycobiome en raison de son environnement acide hostile.

F. Perspectives

Pour pouvoir approfondir notre étude, des techniques de séquençage haut débit tel que le pyrosequençage pourrait apporter de précieuses informations avec la détection des différentes espèces fongiques présentes dans le même échantillon et la quantification de ces espèces. Une autre possibilité serait la réalisation d'une cartographie de l'estomac avec l'étude de plusieurs biopsies réalisées à différents endroits de la muqueuse gastrique. On pourrait également faire une étude de l'évolution de cette « flore fongique » dans le temps avec l'étude de biopsies prélevées régulièrement chez le même patient.

De plus, si cette technique d'identification moléculaire s'est révélée efficace pour la recherche de champignons dans les biopsies gastriques, elle permettra également la recherche de champignons dans n'importe quel échantillon biologique ainsi que l'identification de culture. Ce procédé est donc désormais utilisé en routine au département des agents infectieux du CHU de Poitiers pour le diagnostic différentiel d'infections profondes en cas d'échec des techniques standards.

VII. CONCLUSION

Notre objectif principal était de rechercher et de décrire le mycobiome gastrique. Pour cela nous avons mis au point une technique d'identification moléculaire fongique par amplification génique et séquençage Sanger avec le couple d'amorces universelles pan fongiques ITS1 et ITS4, technique précise et efficace dans des échantillons biologiques sans culture préalable. Les vérifications auxquelles nous avons procédé lors de la mise au point ont confirmé la performance de cette technique sur une large gamme de champignons, avec différentes méthodes d'extraction (thermique, manuelle et automatisée) et sur différents types d'échantillons (cultures fongiques et biopsies).

Nous avons détecté de l'ADN par amplification génique ITS dans 57 des 466 biopsies gastriques étudiées, soit 12,2 %. Pour 35 de ces biopsies gastriques positives, l'identification moléculaire des amplifiats a été réalisée avec l'identification du genre fongique et a même permis d'identifier l'espèce fongique dans 17 de ces biopsies. Pour 20 autres de ces biopsies gastriques positives, soit 35%, l'ADN amplifié n'a pas pu être identifié, du fait de la présence de multiples séquences superposées sur les électrophorégrammes de séquençage. Pour les deux dernières biopsies gastriques positives, nous n'avons pas pu identifier l'ADN amplifié dans aucune des 7 bases de données consultées, il s'agit vraisemblablement de nouvelles espèces fongiques pas encore décrites au niveau moléculaire. Nous avons également pu constater que l'un des ADN amplifiés a révélé un végétal : *Cucurbita sp* et pour 10 autres, l'ADN amplifié correspondait à de l'ADN génomique humain.

Nous avons ensuite établi un lien entre la présence de la bactérie *H. pylori* et celle de champignons au niveau gastrique. En ce qui concerne les 19 genres fongiques identifiés au cours de notre étude, ils étaient dispersés au sein de la classification du règne fongique. De plus, aucun genre de champignon n'a été majoritairement détecté dans les biopsies gastriques des patients et il s'agit principalement de saprophytes de végétaux sans potentiel pathogène.

En conclusion, l'étude des 466 biopsies nous a permis d'observer la rare présence d'ADN fongique dans l'estomac humain (12,2% des biopsies gastriques) avec une

grande diversité de genres fongiques impliqués et un lien avec la présence de la bactérie pro-inflammatoire *H. pylori*. Ces résultats ne permettent pas d'affirmer la présence d'une flore fongique gastrique résidente de type mycobiome. Ainsi malgré l'évolution de la description de la composition du mycobiome humain avec les principaux sites de colonisation fongique (oral, des voies respiratoires, cutané, intestinal et génital), notre étude montre que le compartiment gastrique ne semble pas contenir de mycobiome probablement en raison de son environnement acide hostile.

Nous montrons également que la présence d'ADN fongique dans la muqueuse gastrique de patients infectés par *H. pylori* ne constitue pas un facteur de gravité de l'expression clinique de cette infection.

Si notre étude ne confirme pas l'hypothèse d'un mycobiome gastrique, elle peut constituer un bon point de départ à une étude plus approfondie grâce à des techniques d'identifications plus performantes, tel que le pyroséquençage, ou la réalisation de biopsies supplémentaires différées dans l'espace de la muqueuse gastrique ou dans le temps.

De plus, si cette technique d'identification moléculaire s'est révélée efficace pour la recherche de champignons dans les biopsies gastriques, elle permettra également la recherche de champignons dans n'importe quel échantillon biologique ainsi que l'identification de culture. Ce procédé est donc désormais utilisé en routine au département des agents infectieux du CHU de Poitiers pour le diagnostic d'infections profondes en cas d'échec des techniques standards.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Blackwell M. The Fungi : 2, 3 ... 5,1 Million species ? American Journal of Botany 2011, 98 : 426-438.
2. Courtecuisse R, Duhem B. Champignons de France et d'Europe. Delachaux, Niestlé Ed 2013, 476.
3. Whittaker RH. New concepts of kingdoms of organisms. Science 1969, 163 : 150-160.
4. Woese CR, Balch WE, Magrum LJ, et al. An ancient divergence among the bacteria. J Mol Evol 1977, 9 : 305-311.
5. Woese CR, Kandler O, Wheelis ML. Towards a Natural System of Organisms: Proposal for the domains *Archaea*, *Bacteria*, and *Eucarya*. Proc Natl Acad Sci 1990, 87 : 4576-4579.
6. Woese CR, Fox GE. Phylogenetic structure of the prokaryotic domain : The primary kingdoms. Proc Natl Acad Sci 1977, 74 : 5088-5090.
7. Ainsworth GC, Sussman AS. The Fungi : An Advanced Treatise. Academic Press Ed 1965, 3 : 805.
8. Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycological Research 2007, 3 : 509-547.
9. Marco D. Metagenomics : Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press Ed 2011, 162.
10. Boddy L, Frankland JC, Van West P. Ecology of Saprotrophic *Basidiomycetes*. British Mycological Society 2008, 28 : 277-300.
11. Anderson PK, Cunningham AA, Patel NG, et al. Emerging infectious diseases of plants : Pathogen pollution, climate change and agrotechnology drivers. Trends Ecol Evol 2004, 19 : 535-544.
12. Cui L, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. Genome Medicine 2013, 5 : 63.
13. Chabasse D, Pihet M, Bouchara JP. Emergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine : revue générale. RFL 2009, 416 : 71-86.
14. Hassall A. On the development of *Torulae* in the urine, and on the relation of these fungi to albuminous and saccharine urine. Med Chir Trans 1853, 36 : 23-78.

15. Relman DA. New technologies, human-microbe interactions, and the search of previously unrecognized pathogens. *J Infect Dis* 2002, 186 : 254-258.
16. Huffnagle GB, Noverr MC. The emerging world of the fungal microbiome. *Trends Microbiol* 2013, 21: 334-341.
17. Beck JM, Young VB, Huffnagle GB. The microbiome of the lung. *Transl Res* 2012, 160 : 258-266.
18. Qin J, Li R, Raes J, et al. A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* 2010, 464 : 59-65.
19. Chen Y, Chen Z, Guo R et al. Correlation between gastrointestinal fungi and varying degrees of chronic hepatitis B virus infection. *Diag Microbiol Infect Dis* 2011, 70 : 492-498.
20. Delhaes L, Monchy S, Fréalle E et al. The airway microbiota in cystic fibrosis : a complex fungal and bacterial community -- implications for therapeutic management. *PLoS One* 2012, 7 : e36313.
21. Mitreva M. Structure, function and diversity of the healthy human microbiome. *Nature* 2012, 486 : 207-214.
22. Peterson J, Garges S, Giovanni M, et al. The NIH human microbiome project. *Genome Res* 2009, 19 : 2317-2323.
23. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, et al. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* 2010, 6 : e1000713.
24. Nossa CW, Oberdorf WE, Yang L, et al. Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World J Gastroenterol* 2010, 16 : 4135-4144.
25. Jumpstart Consortium Human Microbiome Project Data Generation Working Group. Evaluation of 16S rDNA-based community profiling for human microbiome research. *PLoS One* 2012, 7 : e39315.
26. Bellemain E, Carlsen T, Brochmann C, et al. ITS as an environmental DNA barcode for fungi : an in silico approach reveals potential PCR biases. *BMC Microbiol* 2010, 10 : 189-197.
27. Dollive S, Peterfreund GL, Sherrill-Mix S, et al. A tool kit for quantifying eukaryotic rRNA gene sequences from human microbiome samples. *Genome Biol* 2012, 13 : R60.

28. White JR, Maddox C, White O et al. CloVR-ITS : Automated internal transcribed spacer amplicon sequence analysis pipeline for the characterization of fungal microbiota. *Microbiome* 2013, 1 : 1-11.
29. Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods* 2010, 7 : 335-336.
30. Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T et al. Introducing mothur : open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol* 2009, 75 : 7537-7541.
31. Botterel F, Angebault C, Bournoux ME. Le mycobiome humain : actualités et perspectives. *RFL* 2015, 469 : 67-73.
32. Drell T, Lillsaar T, Tummeleht L et al. Characterization of the vaginal micro- and mycobiome in asymptomatic reproductive-age Estonian woman. *PLoS One* 2013, 8 : e54379.
33. de Leon EM, Jacobson SJ, Sobel JD, et al. Prevalence and risk factors for vaginal *Candida* colonization in women with type 1 and type 2 diabetes. *BMC Infect Dis* 2002, 2 : 1.
34. Ohmit SE, Sobel JD, Schuman P et al. HIV Epidemiology Research Study (HERS) Group. Longitudinal study of mucosal *Candida* species colonization and candidiasis among human immunodeficiency virus (HIV)-seropositive and at-risk HIV-seronegative women. *J Infect Dis* 2003, 188 : 118-127.
35. Findley K, Oh J, Yang J, et al. NIH Intramural Sequencing Center Comparative Sequencing Program, Kong HH, Segre JA : Topographic diversity of fungal and bacterial communities in human skin. *Nature* 2013, 498 : 367-370.
36. Mukherjee PK, Chandra J, Retuerto M et al. Oral mycobiome analysis of HIV-infected patients : identification of *Pichia* as an antagonist of opportunistic fungi. *PLoS Pathog* 2014, 10 : e1003996.
37. Dupuy AK, David MS, Li L, et al. Redefining the human oral mycobiome with improved practices in amplicon-based taxonomy : discovery of *Malassezia* as a prominent commensal. *PLoS One* 2014, 9 : e90899.
38. Charlson ES, Diamond JM, Bittinger K et al. Lung-enriched organisms and aberrant bacterial and fungal respiratory microbiota after lung transplant. *Am J Respir Crit Care Med* 2012, 186 : 536-545.

39. Park HK, Ha MH, Park SG et al. Characterization of the fungal microbiota (mycobiome) in healthy and dandruff-afflicted human scalps. PLoS One 2012, 7 : e32847.
40. Cui L, Morris A, Ghedin E. The human mycobiome in health and disease. Genome Med 2013, 5 : 63.
41. Noverr MC, Falkowski NR, McDonald RA, et al. Development of allergic airway disease in mice following antibiotic therapy and fungal microbiota increase : role of host genetics, antigen, and interleukin-13. Infect Immun 2005, 73 : 30-38.
42. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. Nat Med 2006, 12 : 1365-1371.
43. Darling WM. Co-cultivation of mycobacteria and fungus. Lancet 1976, 2 : 740.
44. Flahou B, De Baere T, Chiers K, et al. Gastric Infection with *Kazachstania heterogenica* influences the outcome of a *Helicobacter suis* infection in Mongolian gerbils. Helicobacter 2010, 15 : 67-75.
45. Kerr J : Inhibition of fungal growth by *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas cepacia* isolated from patients with cystic fibrosis. J Infect 1994, 28 : 305-310.
46. Jacobs PH. An overview : antifungal treatment, In Fungal Disease : Biology, Immunology, and Diagnosis. Jacobs PH, Nall L, CRC Press Ed 1997, 1-5.
47. Angebault C, Djossou F, Abélanet S et al. *Candida albicans* is not always the preferential yeast colonizing humans : a study in Wayampi Amerindians. J Infect Dis 2013, 208 : 1705-1716.
48. Nagata R, Nagano H, Ogishima D et al. Transmission of the major skin microbiota, *Malassezia*, from mother to neonate. Pediatr Int 2012, 54 : 350-355.
49. Nelson A, De soyza A, Bourke S et al. Assessment of sample handling practices on microbial activity in sputum samples from patients with cystic fibrosis. Lett Appl Microbiol 2010, 51 : 272-277.
50. Harrison MJ, Twomey KB, McCarthy Y et al. Fungal microbiota in the adult cystic fibrosis (CF) airway: characterization by second-generation sequencing and correlation with standard culture-based methods and clinical phenotype. Ir J Med Sci 2012, 181 : 369-437.
51. van der Velden WJ, Netea MG, de Haan AF et al. Role of the mycobiome in human acute graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant 2013, 19 : 329-332.

52. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat Rev Immunol* 2011, 11 : 275-288.
53. McFarland LV, Bernasconi P. *Saccharomyces boulardii* : a review of an innovative biotherapeutic agent. *Microb Ecol Health Dis* 1993, 6 : 157-171.
54. Kühbacher T, Ott SJ, Helwig U et al. Bacterial and fungal microbiota in relation to probiotic therapy (VSL#3) in pouchitis. *Gut* 2006, 55 : 833-841.
55. Ott SJ, Kühbacher T, Musfeldt M et al. Fungi and inflammatory bowel diseases : alterations of composition and diversity. *Scand J Gastroenterol* 2008, 43 : 831-841.
56. Zhang E, Tanaka T, Tajima M et al. Characterization of the skin fungal microbiota in patients with atopic dermatitis and in healthy subjects. *Microbiol Immunol* 2011, 55 : 625-632.
57. Sellart-Altisent M, Torres-Rodriguez JM, Gomez de Ana S et al. Nasal fungal microbiota in allergic and healthy subjects. *Rev Iberoam Micol* 2007, 24 : 125-130.
58. Cho I, Blaser MJ. The human microbiome : at the interface of health and disease. *Nat Rev Genet* 2012, 13 : 260-270.
59. Ostrosky-Zeichner L, Casadevall A, Galgiani JN et al. An insight into the antifungal pipeline : selected new molecules and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 2010, 9 : 719-727.
60. Puel A, Cypowyj S, Marodi L et al. Inborn errors of human IL-17 immunity underlie chronic mucocutaneous candidiasis. *Curr Opin Allergy Clin Immunol* 2012, 12 : 616-622.
61. Rossetti F, Brawner DL, Bowden R, et al. Fungal liver infection in marrow transplant recipients: prevalence at autopsy, predisposing factors, and clinical features. *Clin Infect Dis* 1995, 20 : 801-811.
62. Gudlaugsson O, Gillepsie S, Lee K, et al. Attributable mortality of nosocomial candidemia, revisited. *Clin Infect Dis* 2003, 37 : 1172-1177.
63. Nucci M, Anaissie E, Queiroz-Telles F, et al. Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. *Cancer* 2003, 98 : 315-319.
64. Marr KA, Carter RA, Crippa F, et al. Epidemiology and outcome of mould infections in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin Infect Dis* 2002, 34 : 909-917.
65. Kontoyiannis DP, Wessel VC, Bodey GP, et al. Zygomycosis in the 1990s in a tertiary-care cancer center. *Clin Infect Dis* 2000, 30 : 851-856.
66. Adam O, Merad M, Antoun S, et al. Usefulness of panfungal PCR for the diagnosis of fungal infection in immunocompromised patients. *Pathol Biol* 2004, 52 : 544-549.

67. Sanger F, Nicklen S and Coulson AR. DNA sequencing and chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74 : 5463-5467.
68. Maxam AM and Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977, 74 : 560-564.
69. Hyman ED. A new method of sequencing DNA. *Anal Biochem* 1988, 174 : 423-436.
70. Bartram AK, Lynch MD, Stearns JC, et al. Generation of multimillion-sequence 16S rRNA gene libraries from complex microbial communities by assembling paired-end illumina reads. *Appl Environ Microbiol* 2011, 77 : 3846-3852.
71. Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project : improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res* 2013, 41 : 590-596.
72. Abarenkov K, Nilsson RH, Larsson KH et al. The UNITE database for molecular identification of fungi – recent updates and future perspectives. *New Phytol* 2010, 186 : 281-285.
73. Koljalg U, Nilsson RH, Abarenkov K et al. Towards a unified paradigm for sequence-based identification of fungi. *Mol Ecol* 2013, 22 : 5271-5277.
74. Altschul SF, Gish W, Miller W, et al. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol* 1990, 215 : 403-410.
75. Einsele H, Hebart H, Roller G, et al. Detection and identification of fungal pathogens in blood by using molecular probes. *J Clin Microbiol* 1997, 35 : 1353– 1360.
76. Ferrer C, Colom F, Frases S, et al. Detection and identification of fungal pathogens by PCR and by ITS2 and 5.8S ribosomal DNA typing in ocular infections. *J Clin Microbiol* 2001, 39 : 2873–2879.
77. Hendolin PH, Paulin L, Koukila-Kähkölä P, et al. Panfungal PCR and multiplex liquid hybridization for detection of fungi in tissue specimens. *J Clin Microbiol* 2000, 38 : 4186–4192.
78. Iwen PC, Hinrichs SH, Rupp ME. Utilization of the internal transcribed spacer regions as molecular targets to detect and identify human fungal pathogens. *Med Mycol* 2002, 40 : 87–109.
79. Vilgalys R. Conserved primer sequences for PCR amplification and sequencing from nuclear ribosomal RNA. In Vilgalys lab Mycology, Duke University, USA. Site disponible sur : <http://sites.biology.duke.edu/fungi/mycolab/primers.htm> (Page consultée le 10/09/15).

80. White TJ, Bruns T, Lee S, et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics, In : PCR protocols : a guide to methods and application. Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ Ed 1990, 3 : 315-322.
81. Gardes M, Bruns TD. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes -- application to the identification of *mycorrhizae* and rusts. Mol Ecol 1993, 2 : 113-118.
82. Vilgalys R, Hopple JS, Hibbett DS. Phylogenetic implications of generic concepts in fungal taxonomy : The impact of molecular systematic studies. Mycologica Helvetica 1994, 6 : 73-91.
83. de Hoog GS, Gerrits van den Ende AH. Molecular diagnostics of clinical strains of filamentous Basidiomycetes. Mycoses 1998, 41 : 183-189.
84. Masclaux F, Gueho E, de Hoog GS, et al. Phylogenetic relationships of human-pathogenic *Cladosporium* (*Xylohypha*) species inferred from partial LS rRNA sequences. J Med Vet Mycol 1995, 33 : 327-338.
85. Vilgalys R, Gonzalez D. Organization of ribosomal DNA in the basidiomycete *Thanatephorus praticola*. Curr Genet 1990, 18 : 277-280.
86. Hibbett DS, Vilgalys R. Phylogenetic relationships of the Basidiomycete genus *Lentinus* inferred from molecular and morphological characters. Syst Bot 1993, 18 : 409-433.
87. Lane DJ, Pace B, Olsen GJ, et al. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. Proc Natl Acad Sci USA 1985, 82 : 6955-6959.
88. Loeffler J, Hebart H, Bialek R, et al. Contaminations occurring in fungal PCR assays. J Clin Microbiol 1999, 37 : 1200-1202.
89. Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA Extraction Methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. J Clin Microbiol 2005, 43 : 5122-5128.
90. Marshall BJ, Warren JR. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. Lancet 1984, 1 : 1311-1315.
91. Burucoa C, Megraud F. *Helicobacter pylori*, In : REMIC. Société française de microbiologie Ed 2015, 511-514.
92. D'Elis MM, Czinn SJ. Immunity, inflammation, and vaccines for *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 2014, 1 : 19-26.

93. Eusebi LH, Zagari RM, Bazzoli F. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2014, 1 : 1-5.
94. Axon A. *Helicobacter pylori* and Public Health. *Helicobacter* 2014, 1 : 68-73
95. Frexinos J, Buscail L. Hépatogastro-entérologie proctologie : Pour le praticien. Masson Ed 2003, 713.
96. Kusters JG, Van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. Clin Microbiol Reviews 2006, 19 : 449-490.
97. Yoshiyama H, Nakazawa T. Unique mechanism of *Helicobacter pylori* for colonizing the gastric mucus. Microbes Infect 2000, 2 : 55-60.
98. de Bernard M, Josenhans C. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2014, 1 : 11-18.
99. Venerito M, Nardone G, Selgrad M, et al. Gastric Cancer -- Epidemiologic and Clinical Aspects. *Helicobacter* 2014, 1 : 32-37.
100. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori*-induced gastroduodenal diseases. Annu Rev Pathol 2006, 1 : 63-96.
101. Forman D, Burley VJ. Gastric cancer : Global pattern of the disease and an overview of environmental risk factors. Best pract Res clin Gastroenterol 2006, 20 : 633-649.
102. Brenner H, Rothenbacher D, Arndt V. Epidemiology of stomach cancer. Methods Mol Biol 2009, 472 : 467-477.
103. Lamarque D, Burucoa C, Courillon-Mallet A, et al., et le Groupe d'Etudes Français des *Helicobacter* (GEFH). Révision des recommandations françaises sur la prise en charge de l'infection par *Helicobacter pylori*. Hepato-Gastro et Oncologie digestive 2012, 19 : 475-502.
104. Wroblewski LE, Peek RM, Wilson KT. *Helicobacter pylori* and gastric cancer: factors that modulate disease risk. Clin Microbiol Rev 2010, 23 : 713-739.
105. Cadiot GG, Matuchansky JP, Mignon C. Gastro-entérologie. Ellipses Ed 2005, 750.
106. Ierardi E, Goni E, Losurdo G, et al. *Helicobacter pylori* and nonmalignant diseases. *Helicobacter* 2014, 1 : 27-31.
107. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, et al., et The European *Helicobacter* Study Group (EHSG). Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht IV / Florence Consensus Report. Gut 2012, 61 : 646-664.

108. O'Connor A, Vaira D, Gisbert JP, et al. Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2014. *Helicobacter* 2014, 1 : 38-45.
109. Martin ME, Bhatnagar S, George MD, et al. The impact of *Helicobacter pylori* infection on the gastric microbiota of the rhesus macaque. PLoS ONE 2013, 8 : e76375.
110. Lertpiriyapong K, Whary MT, Muthupalani S, et al. Gastric colonisation with a restricted commensal microbiota replicates the promotion of neoplastic lesions by diverse intestinal microbiota in the *Helicobacter pylori* INS-GAS mouse model of gastric carcinogenesis. Gut 2014, 63 : 54-63.
111. de Korwin JD, Kalach N, Raymond J, et al. Prise en charge diagnostique et thérapeutique en cas d'infection à *Helicobacter pylori*. EMC – Gastro-entérologie 2014, 1 : 1-11.
112. Megraud F, Bessède E, Lehours P. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 2014, 1 : 6-10.
113. Groupe d'Etudes Français des *Helicobacter* (GEFH). Prise en charge thérapeutique de l'infection à H. pylori chez l'adulte. In GEFH. Site disponible sur : <http://www.helicobacter.fr/images/fiche%20seq-pylora%20v4.pdf>
(Page consultée le 18/08/15).

RESUME

Objectif : Notre étude a porté sur la description du mycobiome gastrique et l'évaluation de l'influence mutuelle du mycobiome gastrique et de l'infection par la bactérie *Helicobacter pylori*.

Matériel & Méthode : Dans ce but, nous avons développé une technique d'identification moléculaire fongique par amplification génique et séquençage Sanger avec le couple d'amorces universelles pan fongiques ITS1 et ITS4. Nous avons validé cette méthode sur une large gamme de champignons, avec différentes méthodes d'extraction et sur différents types d'échantillons. Nous avons ensuite étudié les biopsies gastriques de 466 patients infectés ou non par la bactérie *H. pylori* et présentant différentes pathologies gastro-duodénales pouvant être causées par cette infection pro-inflammatoire.

Résultats : L'étude des 466 biopsies gastriques nous a permis d'observer la rare présence d'ADN fongique dans l'estomac humain (12,2% des biopsies gastriques) avec une grande diversité de genres fongiques impliqués et un lien entre la présence d'ADN fongique et celle de la bactérie pro-inflammatoire *H. pylori*. Par contre l'ADN fongique n'est pas plus fréquemment présent en cas de pathologie sévère due à *H. pylori* (ulcères ou cancers gastriques).

Conclusion : Ces résultats ne permettent pas d'affirmer la présence d'une flore fongique gastrique résidente de type mycobiome. Le lien avec la présence de la bactérie *H. pylori* reste inexpliqué. Cependant la présence d'ADN fongique dans la muqueuse gastrique ne constitue pas un cofacteur de gravité de l'expression clinique de l'infection à *H. pylori*.

Mots clés : Mycobiome, gastrique, séquençage, ITS, *Helicobacter pylori*

SERMENT DE GALIEN

~~~~

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, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

**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.