



HAL
open science

Etude épidémiologique des infections à *Fusarium* au CHRU de Nancy sur 10 ans et identification moléculaire d'espèces

Benoît Thomas

► **To cite this version:**

Benoît Thomas. Etude épidémiologique des infections à *Fusarium* au CHRU de Nancy sur 10 ans et identification moléculaire d'espèces. Sciences pharmaceutiques. 2017. hal-01931918

HAL Id: hal-01931918

<https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01931918>

Submitted on 23 Nov 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

UNIVERSITE DE LORRAINE
2017

FACULTE DE PHARMACIE

MEMOIRE
du DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
de BIOLOGIE MEDICALE

Soutenu devant le Jury Interrégional

Le 12 septembre 2017

par THOMAS Benoît
né le 25 03 1988

Conformément aux dispositions de l'arrêté

du 4 octobre 1988 tient lieu de

THESE
pour le DIPLOME D'ETAT
de DOCTEUR en PHARMACIE

Etude épidémiologique des infections à *Fusarium* au CHRU de Nancy sur 10 ans et identification moléculaire d'espèces

Membres du Jury

Président : M. le Professeur C. GANTZER

Juges : Mme le Docteur A. DEBOURGOGNE
Mme le Professeur M. MACHOUART
Mme le Docteur V. DUVAL

UNIVERSITÉ DE LORRAINE
FACULTÉ DE PHARMACIE
Année universitaire 2016-2017

DOYEN

Francine PAULUS

Vice-Doyen

Béatrice FAIVRE

Directeur des Etudes

Virginie PICHON

Conseil de la Pédagogie

Président, Brigitte LEININGER-MULLER

Collège d'Enseignement Pharmaceutique Hospitalier

Président, Béatrice DEMORE

Commission Prospective Facultaire

Président, Christophe GANTZER

Vice-Président, Jean-Louis MERLIN

Commission de la Recherche

Président, Raphaël DUVAL

Responsable de la filière Officine

Responsables de la filière Industrie

Responsable de la filière Hôpital

Responsable Pharma Plus ENSIC

Responsable Pharma Plus ENSAIA

Responsable Pharma Plus ENSGSI

Responsable de la Communication

Responsable de la Cellule de Formation Continue

et individuelle

Responsable de la Commission d'agrément

des maîtres de stage

Responsable ERASMUS

Béatrice FAIVRE

Isabelle LARTAUD,

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Béatrice DEMORE

Jean-Bernard REGNOUF de VAINS

Raphaël DUVAL

Igor CLAROT

Marie-Paule SAUDER

Béatrice FAIVRE

Béatrice FAIVRE

Mihayl VARBANOV

DOYENS HONORAIRES

Chantal FINANCE

Claude VIGNERON

PROFESSEURS EMERITES

Jeffrey ATKINSON

Jean-Claude BLOCK

Max HENRY

Alain MARSURA

Claude VIGNERON

PROFESSEURS HONORAIRES

Pierre DIXNEUF

Marie-Madeleine GALTEAU

Thérèse GIRARD

Michel JACQUE

Pierre LABRUDE

Vincent LOPPINET

Janine SCHWARTZBROD

Louis SCHWARTZBROD

MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES

Monique ALBERT

Mariette BEAUD

Gérald CATAU

Jean-Claude CHEVIN

Jocelyne COLLOMB

Bernard DANGIEN

Marie-Claude FUZELLIER

Françoise HINZELIN

Marie-Hélène LIVERTOUX

Bernard MIGNOT

Jean-Louis MONAL

ASSISTANTS HONORAIRES

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDIAKIS
Marie-France POUCHON
Anne ROVEL
Gabriel TROCKLE
Maria WELLMAN-ROUSSEAU
Colette ZINUTTI

ENSEIGNANTS

Section
CNU*

Discipline d'enseignement

PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS

Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ	82	Thérapie cellulaire
Jean-Louis MERLIN	82	Biologie cellulaire
Alain NICOLAS	80	Chimie analytique et Bromatologie
Jean-Michel SIMON	81	Economie de la santé, Législation pharmaceutique
Nathalie THILLY	81	Santé publique et Epidémiologie

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

Christine CAPDEVILLE-ATKINSON	86	Pharmacologie
Igor CLAROT	85	Chimie analytique
Joël DUCOURNEAU	85	Biophysique, Acoustique, Audioprothèse
Raphaël DUVAL	87	Microbiologie clinique
Béatrice FAIVRE	87	Biologie cellulaire, Hématologie
Luc FERRARI	86	Toxicologie
Pascale FRIANT-MICHEL	85	Mathématiques, Physique
Christophe GANTZER	87	Microbiologie
Frédéric JORAND	87	Eau, Santé, Environnement
Isabelle LARTAUD	86	Pharmacologie
Dominique LAURAIN-MATTAR	86	Pharmacognosie
Brigitte LEININGER-MULLER	87	Biochimie
Pierre LEROY	85	Chimie physique
Philippe MAINCENT	85	Pharmacie galénique
Patrick MENU	86	Physiologie
Jean-Bernard REGNOUF de VAINS	86	Chimie thérapeutique
Bertrand RIHN	87	Biochimie, Biologie moléculaire

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

Béatrice DEMORE	81	Pharmacie clinique
Alexandre HARLE	82	Biologie cellulaire oncologique
Julien PERRIN	82	Hématologie biologique
Marie SOCHA	81	Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique

MAITRES DE CONFÉRENCES

Sandrine BANAS	87	Parasitologie
Xavier BELLANGER	87	Parasitologie, Mycologie médicale
Emmanuelle BENOIT	86	Communication et Santé
Isabelle BERTRAND	87	Microbiologie
Michel BOISBRUN	86	Chimie thérapeutique
François BONNEAUX	86	Chimie thérapeutique
Ariane BOUDIER	85	Chimie Physique
Cédric BOURA	86	Physiologie
Joël COULON	87	Biochimie

Sébastien DADE	85	Bio-informatique
Dominique DECOLIN	85	Chimie analytique
Roudayna DIAB	85	Pharmacie galénique
Natacha DREUMONT	87	Biochimie générale, Biochimie clinique
Florence DUMARCAY	86	Chimie thérapeutique
François DUPUIS	86	Pharmacologie
Adil FAIZ	85	Biophysique, Acoustique
Anthony GANDIN	87	Mycologie, Botanique
Caroline GAUCHER	86	Chimie physique, Pharmacologie
Stéphane GIBAUD	86	Pharmacie clinique
Thierry HUMBERT	86	Chimie organique
Olivier JOUBERT	86	Toxicologie, Sécurité sanitaire

ENSEIGNANTS (suite)

Section
CNU*

Discipline d'enseignement

Alexandrine LAMBERT	85	Informatique, Biostatistiques
Julie LEONHARD	86/01	Droit en Santé
Christophe MERLIN	87	Microbiologie environnementale
Maxime MOURER	86	Chimie organique
Coumba NDIAYE	86	Epidémiologie et Santé publique
Marianne PARENT	85	Pharmacie galénique
Francine PAULUS	85	Informatique
Caroline PERRIN-SARRADO	86	Pharmacologie
Virginie PICHON	85	Biophysique
Sophie PINEL	85	Informatique en Santé (e-santé)
Anne SAPIN-MINET	85	Pharmacie galénique
Marie-Paule SAUDER	87	Mycologie, Botanique
Guillaume SAUTREY	85	Chimie analytique
Rosella SPINA	86	Pharmacognosie
Sabrina TOUCHET	86	Pharmacochimie
Mihayl VARBANOV	87	Immuno-Virologie
Marie-Noëlle VAULTIER	87	Mycologie, Botanique
Emilie VELOT	86	Physiologie-Physiopathologie humaines
Mohamed ZAIYOU	87	Biochimie et Biologie moléculaire

PROFESSEUR ASSOCIE

Anne MAHEUT-BOSSER	86	Sémiologie
--------------------	----	------------

PROFESSEUR AGREGE

Christophe COCHAUD	11	Anglais
--------------------	----	---------

⌘ En attente de nomination

*Disciplines du Conseil National des Universités :

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

81 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85 ; Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingénierie appliquée à la santé

86 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87 : Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

11 : Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littératures anglaises et anglo-saxonnes

SERMENT DES APOTHICAIRES



Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

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

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

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

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

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



« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE
APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS
EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT
ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR
AUTEUR ».

Remerciements :

A Monsieur le Professeur Christophe Gantzer

PU, Faculté de Pharmacie de Nancy, Microbiologie

*Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de cette thèse
Veuillez recevoir toute ma reconnaissance.*

A Madame le Professeur Marie-Claire Machouart

PU-PH, Faculté de Médecine de Nancy, Laboratoire de Parasitologie Mycologie -
CHRU de Nancy

*Je te remercie de juger ce travail ainsi que de m'avoir toujours accueilli
chaleureusement au laboratoire (nous savons que je m'y suis pourtant beaucoup
promené !)*

A Madame le Docteur Véronique Duval

PH, Chef de service du laboratoire du CH d'Epinal

*Tu me fais le plaisir d'évaluer cette thèse, je te remercie de ta présence mais
également de l'excellent semestre passé à respirer l'air vosgien.*

A Madame le Docteur Anne Debourgogne

MCU-PH, Faculté de Médecine de Nancy, Laboratoire de Parasitologie Mycologie -
CHRU de Nancy

*J'aurais beaucoup de remerciements à exprimer mais il va falloir être sélectif. Merci
pour ce sujet, merci pour cet encadrement sans faille, on ne peut plus efficace. Un
grand merci pour toutes les connaissances que tu m'as apportées et un immense
merci pour cette chaise de bureau toujours disponible.*

La rédaction des remerciements est un exercice délicat et périlleux. Périlleux, car on a toutes les chances d'oublier de citer quelqu'un. Périlleux car on n'est jamais sûr de savoir trouver les mots justes. Périlleux, car les remerciements sont la partie de la thèse la plus scrutée et décortiquée. Périlleux enfin, parce que l'anaphore n'est plus à la mode depuis ce présent quinquennat.

Néanmoins il est d'usage d'exprimer ici la reconnaissance que l'on a pour l'ensemble des personnes qui nous ont accompagnées.

A mes parents d'abord, sans qui rien n'aurait été possible

A ma sœur, la dite Titus Poulo (et aussi pour la patrie !)

A l'ensemble de ma famille

A mes amis sur qui je sais pouvoir compter

Nicolas, Arnaud, FX, et Victorien

A ma belle famille

pour l'accueil chaleureux que vous m'avez toujours réservé

Aux internes pour ces quatre belles années

A toutes ces personnes de qualité que j'ai la chance de côtoyer

Gwladys, Carole, Chloé, Alexandra, Sophie, Steph, Maude, Lucie, Brice, Mickael, Alex, Sylvain, Anthony, Michel...

A tous ces Hommes et Femmes de laboratoire qui, quelles que soient leurs tailles, m'ont tant appris.

Un hommage particulier sera rendu ici à l'équipe du laboratoire de Parasito-Mycologie qui pendant 1 an, a bichonné en mon nom les désormais baptisés "FuFu".

A ma **Delphine**, bien sûr

Et enfin à notre petit bonhomme **Louis**, sur mes genoux pendant la rédaction de ces brefs remerciements.

A vous tous, j'exprime en 1246 caractères ma plus profonde gratitude.

Table des matières

Remerciements :	
Table des matières	1
Table des Illustrations.....	5
Abréviations	8
Introduction générale.....	10
1. Revue de la littérature	11
1.1. Taxonomie	11
1.2. Ecologie	13
1.3. Parasitisme - commensalisme.....	16
1.3.1. Colonisation humaine.....	16
1.3.2. Facteurs de pathogénicité liés aux champignons	17
1.3.3. Facteurs de pathogénicité liés à l'hôte	18
1.4. Infections humaines	19
1.4.1. Espèces de <i>Fusarium</i> responsables d'infection humaine	19
1.4.2. Infections localisées	20
1.4.2.1. Onychomycoses.....	20
1.4.2.2. Keratite et endophtalmie	23
1.4.2.3. Infection cutanée.....	25
1.4.2.4. Mycétome	26
1.4.2.5. Infections pulmonaire	26
1.4.2.6. Autres infections localisées	26
1.4.3. Infections disséminées	27
1.5. Diagnostic d'une infection à <i>Fusarium</i>	28
1.5.1. Diagnostic mycologique	29
1.5.1.1. Examen direct	29
1.5.1.2. Culture mycologique	30
1.5.1.2.1. Aspect macroscopique.....	31

1.5.1.2.2.	Aspect microscopique	32
1.5.1.2.3.	Algorithme d'identification phénotypique	33
1.5.1.3.	Identification par spectrométrie de masse	36
1.5.1.4.	Identification par biologie moléculaire.....	37
1.5.2.	Immunodiagnostic	38
1.5.3.	Imagerie médicale	39
1.6.	Stratégie thérapeutique	40
1.6.1.	Traitement des onychomycoses	41
1.6.2.	Traitement des kératites	42
1.6.3.	Traitement des fusarioses localisées.....	42
1.6.4.	Traitement des fusarioses invasives.....	42
2.	Etude épidémiologique au CHRU de Nancy de 2007 à 2016	46
2.1.	Introduction	46
2.1.1.	Présentation de la structure.....	46
2.1.2.	Objectifs de l'étude :	47
2.2.	Matériel et méthode.....	47
2.2.1.	Indicateurs	47
2.2.2.	Recueil de données.....	47
2.2.3.	Interprétations statistiques.....	48
2.3.	Résultats	49
2.3.1.	Evolution de l'isolement de <i>Fusarium sp</i>	49
2.3.2.	Représentativité des deux UF dans l'isolement de <i>Fusarium</i>	52
2.3.3.	Evolution de l'activité de la structure de parasitologie-mycologie	53
2.3.4.	Evolution des isollements de <i>Fusarium</i> au regard de l'activité du laboratoire ...	54
2.3.4.1.	Concernant l'ensemble de la structure de Parasitologie-Mycologie	54
2.3.4.2.	Concernant uniquement l'UF 3152.....	55
2.3.5.	Evolution des isollements de <i>Fusarium</i> au regard de l'isolement de <i>T. rubrum</i> au sein de l'UF 3152.	56
2.3.6.	Représentation de <i>Fusarium</i> dans les principaux tableaux cliniques	57

2.3.7.	Nature des prélèvements positif à <i>Fusarium</i>	58
2.3.8.	Nature des espèces de <i>Fusarium</i> isolées.....	59
2.4.	Discussion.....	60
2.4.1.	Evolution de l'incidence de <i>Fusarium</i>	60
2.4.2.	Espèces de <i>Fusarium</i> en cause	61
3.	Mise en place d'un schéma d'identification d'espèce.....	63
3.1.	Introduction	63
3.2.	Matériel et méthode.....	64
3.2.1.	Sélection des souches	64
3.2.2.	Extraction ADN.....	64
3.2.3.	Amorces de PCR	64
3.2.4.	PCR d'amplification	65
3.2.5.	Séquençage.....	65
3.2.6.	Interprétation et bases de données	65
3.2.7.	Expression des résultats	65
3.3.	Résultats	66
3.3.1.	Sélection des souches	66
3.3.2.	Identification phénotypique.....	67
3.3.3.	Séquençage.....	67
3.3.4.	Identification des <i>Fusarium</i>	68
3.3.5.	Répartition des complexes d'espèces identifiés par biologie moléculaire	85
3.3.6.	Interêt des différents gènes pour l'identification.....	86
3.3.7.	Discordance entre l'identification par biologie moléculaire et phénotypique.....	87
3.4.	Discussion.....	87
3.4.1.	Discordance entre l'identification par biologie moléculaire et phénotypique.....	87
3.4.2.	Identification par biologie moléculaire.....	88
3.4.2.1.	Evaluation des pratiques de routine	88
3.4.2.2.	Evaluation de la base de données spécifique.....	88
3.4.2.3.	Solution mixte	89

3.4.3. Proposition d'un logigramme pour l'identification de <i>Fusarium</i> au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Nancy	90
Conclusion générale.....	91
Bibliographie	92

Table des Illustrations

Liste des tableaux :

Tableau I : Complexe d'espèces de <i>Fusarium</i> impliqués en pathologie humaine	12
Tableau II : Les dix principaux champignons phytopathogènes	14
Tableau III : Isolement des moisissures impliquées en pathologie unguéale selon différentes pays	21
Tableau IV : Algorithme d'identification phénotypique des <i>Fusarium</i> d'après	34
Tableau V : Recommandations de traitement antifongique des fusarioses invasives selon l'ESCMID/ECMM	44
Tableau VI : Recommandations de traitements adjuvants des fusarioses invasives selon l'ESCMID/ECMM	44
Tableau VII : Représentativité des deux UF dans l'isolement de <i>Fusarium</i>	52
Tableau VIII : Evolution du nombre de <i>Fusarium</i> et de <i>T. rubrum</i> isolé au sein de l'UF 315256	
Tableau IX : Amorces de PCR pour les gènes étudiés	64
Tableau X : Programmes d'amplifications géniques pour les différents gènes.....	65
Tableau XI : Comparaison des différentes stratégies d'identification des <i>Fusarium</i>	68
Tableau XII : Pourcentage de similitude moyen et nombre de réponses différentes moyenne par type de complexe d'espèces et par gène	86

Liste des Figures :

Figure 1 : Fusariose des céréales	14
Figure 2 : Infection du poisson zèbre par <i>F. oxysporum</i>	15
Figure 3 : Fréquence de détection des genres fongiques dans des échantillons de selles humaines.....	16
Figure 4 : Fréquence d'isolement des complexes d'espèces de <i>Fusarium</i> impliqués en pathologie humaine	20
Figure 5 : Schéma d'infection de l'ongle	22
Figure 6 : Onychomycose à <i>Fusarium</i>	22
Figure 7 : Observation à la lampe à fente d'une kératite à <i>Fusarium</i>	23
Figure 8 : Observation de filaments en microscopie confocale <i>in vivo</i>	23
Figure 9 : Lien entre kératite à <i>Fusarium</i> , environnement et liquide de conservation de lentille	24
Figure 10 : Nodules cutanés à <i>Fusarium</i> , chez un patient greffé en cellules souches hématopoïétiques.....	25
Figure 11 : Lésion cutanée à <i>F. solani</i> chez un patient atteint de leucémie aigue myéloïde	25
Figure 12 : Mycétome.....	26
Figure 13 : Examen direct au noir de chlorazole et au blankophor d'un ongle d'orteil infecté par <i>Fusarium</i>	29
Figure 14 : Filaments de <i>Fusarium</i> colorés par le periodic acid schiff dans une coupe histologique de biopsie	30
Figure 15 : Morphologie recto-verso d'espèces de <i>Fusarium</i> sur PDA	31
Figure 16 : Fructifications et modes de fructification de <i>Fusarium</i>	32
Figure 17 : Caractéristique macroscopique et microscopique de <i>F. solani</i>	35
Figure 18 : Exemple de spectre de masse d'une souche de <i>F verticillioïdes</i> par MALDI-TOF.....	36
Figure 19 : Nodule sur le poumon gauche d'un patient atteint de leucémie et de fusariose invasive	40
Figure 20 : CMI des principaux antifongiques sur différentes espèces de <i>Fusarium</i>	41
Figure 21 : Organigramme de la structure de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Nancy.	46
Figure 22 : Isolement de <i>Fusarium sp.</i>	49
Figure 23 : Isolement de <i>Fusarium sp.</i> après correction de 2008	51
Figure 24 : Evolution du nombre de prélèvements au sein des deux UF	53
Figure 25 : Evolution de la proportion de <i>Fusarium sp.</i> dans la structure au regard de l'activité	54

Figure 26 : Evolution de la proportion de <i>Fusarium sp.</i> dans la structure au regard de l'activité après correction de 2008	55
Figure 27 : Evolution de la proportion de <i>Fusarium sp.</i> au regard de l'activité au sein de l'UF 3152.....	56
Figure 28 : Evolution de la proportion de <i>Fusarium sp.</i> au sein des principaux tableaux cliniques	57
Figure 29 : Nature des prélèvements positifs à <i>Fusarium</i>	58
Figure 30 : Espèces de <i>Fusarium</i> isolées de 2007 à 2016.	59
Figure 31 : Répartition des espèces de <i>Fusarium</i> isolés pendant l'étude prospective et identifiés par phénotypie.....	67
Figure 32 : Répartition des complexes d'espèces de <i>Fusarium</i> identifiés par biologie moléculaire.....	85
Figure 33 : Logigramme d'identification de <i>Fusarium</i> au laboratoire de Parasitologie-Mycologie	90

Abréviations

CHRU : Centre Hospitalier Régional Universitaire

CMI : Concentration minimale inhibitrice

ECMM : European confederation of medical mycology

EF1 α : translation elongation factor 1 alpha

ESCMID : Société européenne pour la microbiologie clinique et les maladies infectieuses

FCSC : *F. chlamydosporum* species complex

FDSC : *F. dimerum* species complex

FIESC : *F. incamatum* - *F. equisetii* species complex

FOSC : *F. oxysporum* species complex

FSAMSC : *F. sambucinum* species complex

FSSC : *F. solani* species complex

FTSC : *F. tricinctum* species complex

G-CSF : granulocyte colony-stimulating factor

GFSC : *Gibberella fujikuroi* species complex

GM-CSF : granulocyte macrophage colony-stimulating factor

ITS : Internal transcribed spacer

LBM : Laboratoire de biologie médicale

MALDI-TOF : Matrix assisted laser desorption ionisation- Time of fly

MLST : MultiLocus Sequence Typing

PCR : polymérase chaine reaction

PDA : potato dextrose agar

PFGM : Plateforme de génomique microbienne

PFID : Plateforme d'immunodiagnostic

RPB1 : largest subunit of RNA Polymerase

RPB2 : second largest subunit of RNA polymerase

SIL : Système d'informatique de laboratoire

SPM : Structure de Parasitologie Mycologie

UF : Unité fonctionnelle

UFC : Unité Formant Colonie

Introduction générale

Les champignons du genre *Fusarium* sont des moisissures largement distribuées dans l'environnement mais ne sont pas au premier plan du point de vue des maladies infectieuses humaines.

Les études environnementales sont pléthoriques. Du fait de leurs importantes phytopathogénités, leurs résistances remarquables aux traitements et leurs propriétés de synthèse de mycotoxines, les *Fusarium* sont des moisissures bien connues des biologistes environnementaux. A contrario, malgré un éventail d'infection humaine assez large, allant des simples infections unguéales à des septicémies souvent létales, ces champignons ne sont que peu connus sur leur versant médical, du fait principalement de leur faible prévalence par rapport aux infections dûes à *Aspergillus* par exemple.

Cette thèse, centrée sur l'intérêt médical, vise deux objectifs principaux. Outre une revue de la littérature nécessaire à l'actualisation des connaissances, le premier objectif est épidémiologique : il s'agit tout d'abord de déterminer l'infectiosité locale au CHRU de Nancy de *Fusarium* et son évolution sur une décennie. Ainsi nous avons pu réaliser un véritable état des lieux des fusarioses lorraines, ceci aussi bien en termes de types d'infections que d'espèces en cause, le tout dans une logique dynamique d'évolution sur 10 ans.

Le deuxième objectif est d'ordre diagnostique : il vise à évaluer et à améliorer la démarche du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Nancy en ce qui concerne l'identification des champignons du genre *Fusarium*. Un certain nombre de points de fragilité sont pressentis dans la démarche actuelle, sans toutefois jamais avoir été formellement étudiés. L'objectif est donc de les confirmer ou non et d'en déduire une démarche plus robuste du point de vue de l'identification d'espèces des champignons du genre *Fusarium*.

1. Revue de la littérature

1.1. Taxonomie

Le mot taxonomie provient du grec « taxis » qui signifie « placement, ordre, classement » et de « nomos » qui se traduit par « loi, règle ». La taxonomie (ou taxinomie) est donc la science qui a pour objectif de décrire et de regrouper en une entité cohérente (taxons) les organismes vivants. Depuis de très nombreux siècles, la curiosité humaine et scientifique a poussé certains hommes à s'intéresser de près à leur environnement et à le décrire. Les plus anciennes traces de classification des êtres vivants connues à ce jour remontent au IV^e siècle avant JC. Aristote dans son ouvrage intitulé *Histoire des animaux* fut le premier à esquisser une taxonomie du règne animal tandis qu'il est généralement attribué à Théophraste dans un atlas de botanique intitulé *Histoire des plantes*. Ces ouvrages furent des références pendant de très nombreux siècles et c'est seulement au XVIII^{ème} siècle que Carl von Linné, suivi entre autres de Charles Darwin, révolutionnèrent la taxonomie et la prolongèrent par la systématique scientifique en vue de hiérarchiser les taxons entre eux. Jusqu'au milieu du XX^{ème} siècle la taxonomie reposait alors exclusivement sur des caractéristiques phénotypiques. C'est alors avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire que la taxonomie des êtres vivants fut totalement remaniée et est encore aujourd'hui en constante évolution. La mycologie et avec elle le genre *Fusarium* n'échappa pas à ce remaniement profond.

Le genre *Fusarium* appartient au règne des *Fungi*, au phylum des *Ascomycota*, à la classe des *Pezizomycotina*, à l'ordre des *Hypocreales* et à la famille des *Hypocreaceae* [1]. Il s'agit d'un genre à taxonomie très complexe et profondément remodelée par les techniques de biologie moléculaire.

Le genre *Fusarium* correspond à des espèces anamorphes (formes asexuées) mais certains complexes d'espèces possèdent des formes téléomorphes (formes sexuées); c'est notamment le cas de *Fusarium solani* ou de *Fusarium verticillioides*, ces espèces correspondant aux genres *Nectria* ou *Gibberella* [2]. Néanmoins, certains complexes d'espèces, comme *Fusarium oxysporum* sont connus exclusivement sous formes anamorphes. Deux noms différents peuvent ainsi désigner la même espèce ou le même complexe selon que la classification historique repose sur la forme sexuée ou non. En 2013, une communication du code international pour la nomenclature des algues, champignons et plantes désapprouve cette double nomenclature [3]. Il en résulte qu'un seul nom de genre et d'espèce doit être choisi pour désigner un champignon. En ce qui concerne les *Fusarium*, *Nectria*, *Gibberella*, et autres genres associés (*Neocosmospora*, *Haematonectria*,

Cyanonectria, *Geejayessia* et *Albonectria*), des experts internationaux ont statué pour que le nom de genre unique soit *Fusarium* [4]. Les classifications historiques basées sur des critères phénotypiques (sexuels, morphologiques, utilisations de substrats...) ont été entièrement repensées par l'analyse génomique ; ces champignons sont désormais classés en une dizaine de complexe d'espèces regroupant plus de 200 spécimens [5]. Approximativement 70 spécimens de *Fusarium* ont été impliqués en pathologie humaine ou animale [6]. Ces spécimens ont été regroupés en complexe d'espèces (Tableau I).

Tableau I : Complexe d'espèces de *Fusarium* impliqués en pathologie humaine [6]

Complexe d'espèce <i>F. incarnatum</i> - <i>F. equisetii</i> (FIESC)	<i>F. lacertarum</i>
	<i>F. equisetii</i>
	18 espèces sans nom
Complexe d'espèce <i>F. sambucinum</i> (FSAMSC)	<i>F. armeniacum</i>
	<i>F. brachygibbosum</i>
	<i>F. sporotrichioides</i>
Complexe d'espèce <i>F. tricinctum</i> (FTSC)	<i>F. acuminatum</i>
	<i>F. flocciferum</i>
	2 espèces sans nom
Complexe d'espèce <i>Gibberella fujikuroi</i> (GFSC)	<i>F. napiforme</i>
	<i>F. gutiforme</i>
	<i>F. verticillioides</i>
	<i>F. thapsinum</i>
	<i>F. nygamai</i>
	<i>F. acutatum</i>
	<i>F. fujikuroi</i>
	<i>F. proliferatum</i>
	<i>F. sacchari</i>
	<i>F. ananatum</i>
<i>F. subglutinans</i>	
Complexe d'espèce <i>F. oxysporum</i> (FOSC)	3 espèces sans nom
Complexe d'espèce <i>F. chlamydosporum</i> (FCSC)	3 espèces sans nom
	<i>F. concolor</i>
	<i>F. cf. lateritium</i>
Complexe d'espèce <i>F. solani</i> (FSSC)	<i>F. falciforme</i>
	<i>F. lichenicola</i>
	<i>F. keratoplasticum</i>
	<i>F. petroliphilum</i>
	17 espèces sans nom
Complexe d'espèce <i>F. dimerum</i> (FDSC)	<i>F. delphinoides</i>
	<i>F. penzigii</i>
	<i>F. dimerum</i>
	2 espèces sans nom

1.2. Ecologie

Les *Fusarium* sont des champignons ubiquitaires. Ils peuvent être retrouvés sous toutes latitudes, aussi bien tempérées que tropicales [7]. Certains d'entre eux ont été isolés dans des climats particulièrement hostiles tels que des régions polaires, montagneuses ou désertiques [8]. Les *Fusarium* sont présents au sein de tous les types de matrices. Ils peuvent être retrouvés dans les sols, à la surface des végétaux, dans la poussière de l'air [9] ainsi que dans les eaux, y compris dans les eaux marines [10]. Ces données expliquent ainsi la dispersion « abiotique », parfois à longue distance, de ces pathogènes par le vent ou la pluie [9]. En parallèle de cette dissémination, il existe également une dissémination dite « biotique », avec intervention d'un être vivant comme un oiseau ou un insecte. Nous citerons ici l'exemple de *Sitodiplosis mosellana* (cécidomyie orangée du blé), insecte fréquemment responsable de la dissémination de spores de *Fusarium* dans les cultures céréalières [11].

Les *Fusarium* sont des êtres vivants pouvant s'adapter à des environnements extrêmes, par exemple, des champignons du complexe FSSC ont été isolés à Tchernobyl, site ukrainien pourtant hautement radioactif [12].

Ces champignons ubiquitaires ne sont pas inoffensifs pour les autres organismes vivants, qu'ils s'agissent de végétaux ou d'animaux. En effet, de très nombreuses espèces de *Fusarium* sont phytopathogènes et sont ainsi responsables d'importants dommages sur les cultures céréalières humaines aboutissant à la destruction de nombreuses récoltes [8]. Concernant *Fusarium oxysporum* (complexe d'espèce FOOSC) en particulier, il a été montré que ce champignon est responsable de maladies chez plus d'une centaine d'espèces végétales [13]. En outre, dans une récente étude classant les dix espèces de champignons les plus pathogènes pour les plantes, *Fusarium oxysporum* a été classé cinquième ; la quatrième place revenant à un autre *Fusarium* : *Fusarium graminearum* [14] (Tableau II) .

Tableau II : Les dix principaux champignons phytopathogènes [14]

Rang	Agent pathogène fongique
1	<i>Magnaporthe oryzae</i>
2	<i>Botrytis cinerea</i>
3	<i>Puccinia</i> spp.
4	<i>Fusarium graminearum</i>
5	<i>Fusarium oxysporum</i>
6	<i>Blumeria graminis</i>
7	<i>Mycosphaerella graminicola</i>
8	<i>Colletotrichum</i> spp.
9	<i>Ustilago maydis</i>
10	<i>Melampsora lini</i>

A titre d'exemple nous ne parlerons ici que de la fusariose des céréales (blé, orge, maïs...), caractérisée par le flétrissement des épis et une sénescence prématurée de ceux-ci. Les grains fusariés, sont alors petits, ridés et parfois recouverts d'un duvet blanc-rose (Figure 1) [15].

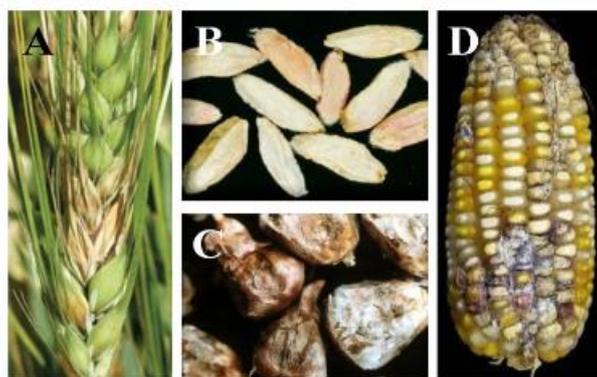


Figure 1 : Fusariose des céréales [15]

A : épis fusariés, B : grains de blé ridés et rosés, C : grains de maïs fusariés, D : épi de maïs fusariés

La littérature fait également état de très nombreuses infections animales et humaines, que les animaux soient terrestres ou aquatiques. Une récente étude de 2016 décrit notamment la pathogénicité de *F. oxysporum* chez le poisson zèbre allant jusqu'à la mort de celui-ci (Figure 2) [16].

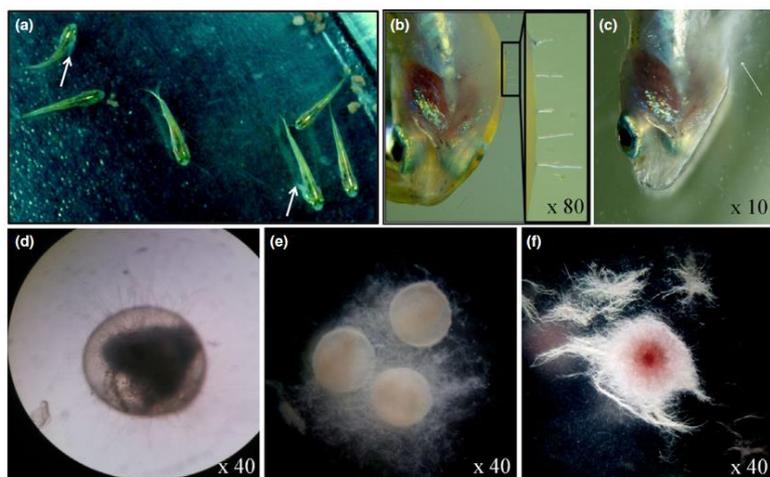


Figure 2 : Infection du poisson zèbre par *F. oxysporum*. [16]

Poisson zèbre (a) Végétation fongique (b,c) Infection fongique de différents stades embryonnaires (d-f)

Dans cette thèse, nous nous intéresserons plus particulièrement aux fusarioses humaines, mais il est important de garder à l'esprit qu'un même *Fusarium* peut infecter une très grande variabilité d'hôtes. Cette diversité a été démontrée par typage moléculaire lors d'une étude de 2006 sur le complexe *F. solani* (FSSC) entre hôtes humains et végétaux [17]. De même, dans une étude belge de 2016, les auteurs suggèrent un lien entre l'importation de bananes infectées par *F. musae* (complexe d'espèce FFSC) et des cas de fusariose humaine concomitamment observés [18].

D'autre part, les champignons du genre *Fusarium* peuvent être des agents d'infections nosocomiales, d'autant plus facilement que l'hôpital concentre une population de patients immunodéprimés sujets aux infections microbiennes. Dans l'environnement hospitalier, les *Fusarium* posent donc également un problème écologique majeur. Depuis plusieurs années, le réseau d'eau hospitalier a été décrit comme un réservoir à *Fusarium* [19]. Ainsi, dans une étude dijonnaise de 2012, les auteurs ont décelé la présence de *F. oxysporum* et *F. dimerum* dans la quasi-totalité des échantillons d'eaux prélevés dans le CHRU de Dijon (en rénovation au moment de l'étude) : 100 % des échantillons retrouvant plus de 5 UFC/L dans 2 unités de soins d'un premier bâtiment et 94 % d'échantillons positifs dans un second bâtiment distant du premier de 3 km [20]. De surcroît, dans une toute récente publication inter-hospitalière, cette équipe dijonnaise associée à une équipe nancéenne, a montré la colonisation par un même clone de *F. oxysporum*, des circuits d'eaux des deux CHRU pourtant distant de plusieurs centaines de kilomètres [21]. Ces études posent donc le problème de l'efficacité des mesures de décontamination fongique des eaux hospitalières et interrogent quant à une dissémination de *F. oxysporum*.

1.3. Parasitisme - commensalisme

Les *Fusarium* sont largement distribués dans l'environnement, il est donc fréquent que les humains se retrouvent en contact avec ces champignons. Pour autant ces rencontres n'engendrent pas systématiquement de pathologies ; celles-ci résultent de facteurs particuliers relatifs au parasite et à l'hôte.

1.3.1. Colonisation humaine

La littérature ne fourmille pas d'études quant à la colonisation humaine par *Fusarium*, cependant avec l'avènement des techniques de séquençage génomique haut débit, le génome de *Fusarium* a été retrouvé dans ce qu'il convient d'appeler le « mycobiome ».

Au sein de la cavité buccale humaine, deux publications portant sur l'étude du microbiote ont retrouvé un portage d'environ 30 % de *Fusarium* chez des individus sains : une étude de 2010 réalisée sur une vingtaine d'individus sains [22] ainsi qu'une étude plus récente de 2015 portant sur 12 individus sains et 12 individus infectés par le VIH. Particularité de cette dernière publication, le génome de *Fusarium* a été exclusivement retrouvé (dans 33 % des cas) chez les individus sains [23].

Concernant la colonisation du tube digestif, une étude de 2005 portant sur la flore digestive d'un modèle murin a rapporté la présence du genre *Fusarium* [24], mais c'est surtout dans une récente étude que le genre *Fusarium* a été retrouvé en majorité (> 90 %) dans des selles humaines de 16 sujets en bonne santé suivant un régime végétarien (Figure 3) [25].

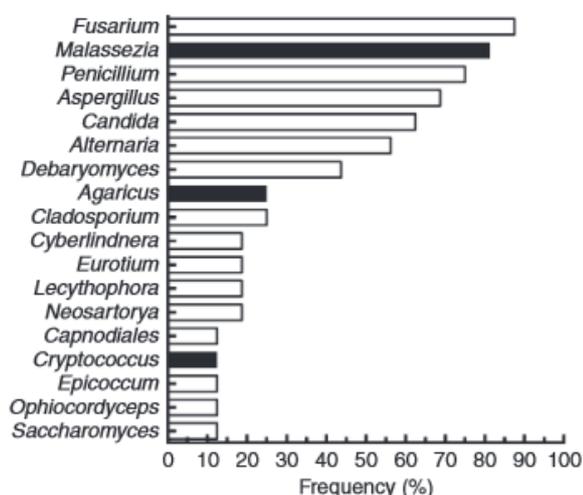


Figure 3 : Fréquence de détection des genres fongiques dans des échantillons de selles humaines [25]

Somme toute, bien que ces données suggèrent un portage asymptomatique de *Fusarium*, il n'existe pas à l'heure actuelle, de cas démontrés d'infections à partir de la flore digestive endogène.

1.3.2. Facteurs de pathogénicité liés aux champignons

La capacité d'un agent fongique à parasiter les tissus humains est en lien avec plusieurs caractéristiques propres du pathogène : production enzymatique, production de mycotoxine, capacité d'adhésion, croissance à 37°C... [2]

Plusieurs publications ont ainsi montré une adhérence particulière des *Fusarium* et leur capacité à former des biofilms sur des matières plastiques, matières entrant largement dans la composition des dispositifs médicaux et constituant autant de points d'entrées du pathogène : cathéter, lentille ... Le champignon, ainsi intégré dans une matrice inorganique endogène, devient alors moins accessible aux différents traitements antifongiques et aux solutions de nettoyage du matériel médical [2] [26] [27]. Des modélisations *in vitro* d'interactions entre des *Fusarium* et les lentilles de contact ont été mises au point et ont montré que *F. solani* est capable de s'arrimer aux lentilles de contact de manière suffisamment importante pour que les rinçages avec les solutions de nettoyage à lentilles ne permettent pas de l'éliminer complètement [28]. De plus il est démontré que cette capacité d'accroche est pathogène dépendante, tous les différents spécimens d'une même espèce, et à fortiori toutes les espèces de *Fusarium* ne présentant pas la même propension à l'adhésion. En effet une étude de 2009 a montré que certains génotypes de souches de *F. solani* ont une pénétration plus rapide et plus extensive que celle observée chez d'autres génotypes de *F. solani* ou que d'autres souches du complexe d'espèces *F. oxysporum* [29].

Les toxines produites par des champignons sont appelées mycotoxines. Il s'agit de métabolites secondaires ne jouant pas de rôle strict dans la croissance du champignon, mais qui vont avoir une action néfaste sur d'autres organismes vivants, végétaux ou animaux. L'exemple le plus connu de pathologie humaine liée à des mycotoxines est l'ergotisme, pathologie mortelle en lien avec l'ingestion d'alcaloïdes de l'ergot de seigle *via* des céréales contaminées par un champignon, *Claviceps purpurea*. Les mycotoxines n'induisent pas de réponses immunitaires chez l'homme, mais peuvent être à l'origine de toxicité aiguë ou chronique, ou bien être mutagène voire tératogène. Les mycotoxines les plus fréquemment retrouvées sont les fumonisines, les trichothécènes, la zéaralénone, les aflatoxines ou l'ochratoxine A [30]. A l'exception des deux dernières, les *Fusarium* sont producteurs de mycotoxines, en niveau variable selon l'espèce, ces toxines leur conférant un pouvoir pathogène important vis-à-vis des végétaux ou des animaux [31].

Concernant l'Homme, l'aleukie alimentaire toxique secondaire à la consommation de céréales colonisées par *Fusarium sporotrichioides* et *Fusarium poae* est la plus répandue des mycotoxicoses dues à des champignons du genre *Fusarium*. Des troubles gastro-intestinaux puis secondairement des symptômes cutanés et hématologiques avec immunosuppression sont les signes cliniques principaux.

D'autres mycotoxicoses dues à l'ingestion de toxines produites par des *Fusarium* se manifestent sous forme de troubles gastro-intestinaux, neurologiques ou d'ostéo-arthrose dystrophique chronique [32].

Outre la pathogénicité directe des mycotoxines, plusieurs études suggèrent que les mycotoxines de *Fusarium* sont des facteurs aggravant de nombreuses autres pathologies infectieuses : bactérienne (salmonellose, nécrose entérique par *Clostridium perfringens* ...), virale (réovirus...) ou même fongique (aspergillose pulmonaire) [33].

Une action myélotoxique et immunosuppressive par la production *in vivo* de mycotoxines de *Fusarium* pouvant prolonger l'aplasie médullaire de patient d'hématologie a également été évoquée [34].

La littérature n'est pas foisonnante d'étude *in vivo* de la virulence des *Fusarium* ; néanmoins concernant spécifiquement les espèces du complexe *F. solani*, une ancienne étude a démontré une virulence particulière pour cette espèce chez un modèle murin d'individu immuno-compétent, la médiane de suivi se situait alors à 14 jours tandis que pour *F. oxysporum*, *F. verticilloïdes* et *F. proliferatum*, la majorité des animaux était encore en vie à la fin de la période d'observation d'un mois [35].

1.3.3. Facteurs de pathogénicité liés à l'hôte

La propension d'un *Fusarium* à engendrer une pathologie dépend également du terrain sur lequel il va pouvoir se développer ; cette notion est primordiale pour les infections à agents opportunistes tels que les *Fusarium*.

De nombreux facteurs locaux de l'hôte vont favoriser la prolifération des champignons. Au niveau oculaire, le port de lentille de contact, la baisse des sécrétions lacrymales ou bien leurs concentrations en IgA jouent un rôle dans les kératites à *Fusarium* ; au niveau cutané l'existence préalable d'ulcération ou de traumatisme sont également des facteurs prédisposants [34].

En ce qui concerne les fusarioses invasives ; il existe peu d'études sur les mécanismes de défense immunitaire de l'hôte, mais ces mycoses sont à rapprocher des autres mycoses invasives à filamenteux comme l'aspergillose. Le facteur essentiel est l'immunodépression

de l'hôte, notamment *via* une diminution de l'immunité innée marquée par une neutropénie. En effet seuls les patients immunodéprimés sont susceptibles de déclarer une fusariose invasive ou disséminée [36]. Par ailleurs la profondeur et la durée de la neutropénie ainsi qu'un traitement par corticoïdes sont des facteurs de mauvais pronostic [37]. Les patients atteints d'hémopathie maligne ou allogreffés sont donc des hôtes de choix pour les *Fusarium*. Les traitements antifongiques empiriques, largement utilisés en hématologie clinique, pourraient également favoriser leurs sélections [2].

Les défenses immunitaires innées jouent un rôle primordial contre les infections à moisissures [38]. Les macrophages et les polynucléaires neutrophiles vont endommager les filaments mycéliens et phagocyter le champignon, empêchant ainsi son développement. Par ailleurs un grand nombre de cytokines et de facteurs de croissance cellulaire interviennent dans les défenses innées : l'interféron gamma, le GCSF (granulocyte colony-stimulating factor), le GMCSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor), IL 15, IL 8 sont autant de molécules favorisant l'activité des polynucléaires et des macrophages.

Au début des années 1990, un modèle murin d'infection à *Fusarium* a été développé et a montré une corrélation entre l'inoculum de champignon et sa mortalité. Ce modèle a surtout permis de montrer que chez des souris immunocompétentes, les *Fusarium* étaient à l'origine d'abcès nécrotiques localisés (caractérisés histologiquement par des filaments septés, des polynucléaires et des macrophages) tandis que chez des souris neutropéniques, aucune réaction inflammatoire n'est retrouvée mais l'infection est disséminée dans la quasi-totalité des organes internes [39].

1.4. Infections humaines

Outre les pathologies indirectes induites par les mycotoxines, les champignons du genre *Fusarium* sont responsables de diverses infections humaines : infections localisées ou disséminées, manifestations allergiques, manifestations toxiques.

1.4.1. Espèces de *Fusarium* responsables d'infection humaine

Une grande variété d'espèces de *Fusarium* peut être responsable de fusariose. En préambule, afin de décrire les principaux *Fusarium* en cause en pathologie humaine, nous rapportons une étude de 2011 s'attachant à l'identification de 717 spécimens clinique de *Fusarium* toutes localisations confondues (Figure 4) [40].

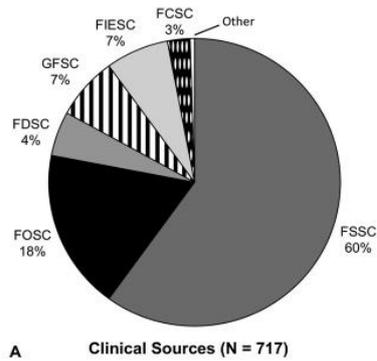


Figure 4 : Fréquence d'isolement des complexes d'espèces de *Fusarium* impliqués en pathologie humaine [40]

1.4.2. Infections localisées

1.4.2.1. Onychomycoses

Les onychomycoses sont définies comme des infections fongiques de l'ongle. Ces infections touchent environ un vingtième de la population mondiale [41]. Cette proportion varie sensiblement selon les zones géographiques, selon les conditions climatiques (chaleur, humidité), les modes de vie, l'accès aux soins ... Ainsi en Inde, la prévalence des onychomycoses atteint jusqu'à 20 % de la population [42] tandis que dans les pays développés cette proportion est de l'ordre de 2-3 % [43]. Les infections fongiques de l'ongle représentent près d'un tiers des mycoses superficielles et environ la moitié des pathologies unguéales [43]. La majeure partie des onychomycoses est imputable aux dermatophytes, néanmoins les moisissures sont responsables d'environ 10 % des infections fongiques unguéales [44]. Il est également à noter que d'une façon générale, les ongles de pieds sont plus souvent infectés que les ongles des mains.

Les principales moisissures responsables d'onychopathie sont des champignons appartenant aux genres *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Acremonium*, *Fusarium*, *Scytalidium*, *Alternaria*, *Nattrassia*... Leurs proportions varient considérablement selon les études. Les différences dans la méthodologie (technique d'identification et mode de culture), les populations étudiées (habitude de marcher pieds nus, fréquentation de piscines, traumatisme du pied ...) et les zones géographiques étudiées peuvent expliquer l'hétérogénéité des résultats. A titre d'exemples, 50 % de *Fusarium* sont retrouvés dans une étude colombienne [45], moins de 2 % dans une étude mexicaine [44], 44 % en Italie [46], 0% au Canada [47]... Néanmoins, une revue de 2012 compilant plusieurs études réalisées sur quatre continents classe les champignons du genre *Fusarium* à la seconde place en

fréquence derrière *Scopulariopsis*, et devant *Aspergillus*, *Scytalidium* et *Acremonium* (Tableau III) [48].

Tableau III : Isolement des moisissures impliquées en pathologie unguéale selon différents pays [48]

	Canada	Brésil	Colombie	Espagne	Italie	Grèce	Turquie	Pakistan	Thaïlande	Total
<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	-	-	-	2	18	29	-	2	-	51
<i>Fusarium sp</i>	-	8	8	-	8	-	2	2	5	33
<i>Aspergillus sp</i>	2	1	-	-	14	2	3	2	-	24
<i>Scytalidium dimidiatum</i>	2	-	8	-	-	-	-	1	12	23
<i>Acremonium sp</i>	2	-	-	-	3	10	2	1	-	18
<i>Natrassia mangiferae</i>	-	4	-	-	-	-	-	-	-	4
<i>Alternaria sp</i>	-	-	-	-	-	2	-	1	-	3
Total	6	13	16	2	43	43	7	9	17	156

S'il est déjà difficile de décrire avec précision la répartition des genres de moisissures impliqués dans des infections unguéales, il est encore plus délicat de décrire les espèces en cause. Néanmoins nous citerons ici une étude indienne de 2016 qui a identifié par biologie moléculaire les espèces de *Fusarium* impliquées dans des onychomycoses. Sur 500 patients atteints d'onychomycoses, la prévalence des infections à moisissures était de 28.7 %, les *Fusarium* étant la principale moisissure isolée (environ 10 % des onychopathies). Il est intéressant de remarquer que tous les spécimens de *Fusarium* isolés et identifiés par biologie moléculaire appartiennent au complexe d'espèce FSSC (*F. keratoplasticum* et *F. falciforme* principalement)[42]. Cette constatation est corroborée par de nombreuses études : les *Fusarium* du complexe d'espèce FSSC arrivent en tête des isollements de champignon du genre *Fusarium* [46], [49].

Les moisissures, à la différence des dermatophytes, n'ont pas d'activité kératolytique, elles ne peuvent donc se développer que dans l'espace intercellulaire non kératinisé. Ainsi, au détour de la destruction de kératine par les dermatophytes, d'un traumatisme ou d'une pathologie unguéale sous-jacente, les moisissures vont en profiter pour infecter l'ongle fragilisé [50].

Les champignons du genre *Fusarium* peuvent infecter l'ongle en différents endroits ; il en résulte des infections cliniquement différentes :

- Infection sous unguéale proximale (Figure 5 flèche A, Figure 6 A) dans laquelle des leuconychies et/ou une inflammation péri unguéale peuvent être associées.
- Infection superficielle (Figure 5 flèche B, Figure 6 B)
- Infection sous unguéale distale (Figure 5 flèche C, Figure 6 C)

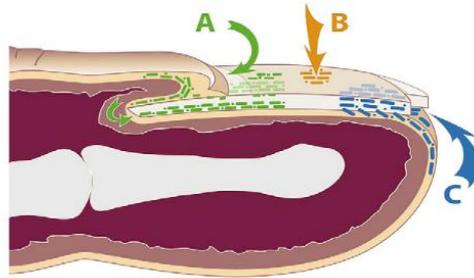


Figure 5 : Schéma d'infection de l'ongle [51]



Figure 6 : Onychomycose à *Fusarium*

(A : Infection proximale, B : Infection superficielle, C : Infection distale) [43]

Comme nous l'avons vu, les *Fusarium* sont des champignons ubiquitaires et saprophytes. Lorsqu'un prélèvement mycologique unguéal s'avère positif à *Fusarium*, la question se pose de savoir si ce champignon est responsable de l'infection ou si ce n'est qu'un contaminant des cultures ?

Dans ce contexte d'incertitude, plusieurs éléments sont à prendre en compte : la clinique, la qualité du prélèvement, le nombre de prélèvement positif, la culture (la moisissure est-elle seule isolée ou associée à un dermatophyte ?) et l'examen direct d'un fragment d'ongle vont permettre de trancher en faveur ou non de l'implication de la moisissure. En outre un examen direct révélant des filaments mycéliens septés associés à une culture pure à

Fusarium sur plusieurs prélèvements ne laissera pas de doute quant à l'imputabilité du champignon.

1.4.2.2. **Kératite et endophtalmie**

Une kératite se définit comme une inflammation de la cornée. La principale cause de kératite est infectieuse et notamment fongique. Une kératite fongique à *Fusarium* n'est pas cliniquement différenciable d'une autre kératite fongique ; elle se caractérise par une ulcération cornéenne, souvent associée à une suppuration. Le patient infecté se plaint de douleur oculaire, d'une sensation de corps étranger, associée ou non à une baisse de l'acuité visuelle [52]. Cliniquement l'œil est rouge et certaines manifestations peuvent orienter sur l'étiologie fongique de la kératite : présence de marges d'infiltrat en « plumes », présence de lésions satellites, d'infiltrats en anneaux, de plaques endothéliales ou d'un hypopion (pue s'accumulant dans la partie inférieure de l'œil) (Figure 7) [53] [54]. Devant le risque d'évolution en endophtalmie (infection de l'ensemble des tuniques oculaires pouvant conduire à la perte de l'œil) il est important d'évoquer rapidement le diagnostic. Le prélèvement microbiologique et la méthode non invasive de microscopie confocale *in vivo* (visualisation des filaments fongiques directement sur la cornée) répondent à cet impératif (Figure 8) [55].



Figure 7 : Observation à la lampe à fente d'une kératite à *Fusarium* [53]

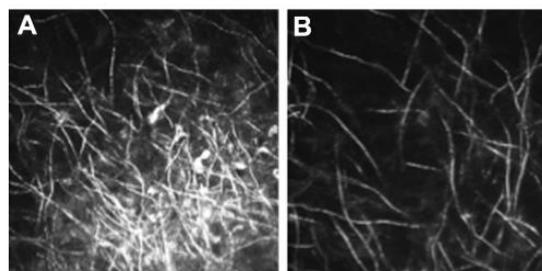


Figure 8 : Observation de filaments en microscopie confocale *in vivo*, au centre de l'ulcération (A) et en périphérie (B) [55]

Le premier cas décrit de kératite fongique, remonte à 1879, chez un agriculteur qui avait été victime d'un traumatisme oculaire en lien avec l'utilisation de lames pour la coupe du blé. Aujourd'hui la kératite fongique est largement répandue à travers le monde et est causée par une grande variété de champignon. Comme pour les onychomycoses, la répartition des espèces fongiques en cause est très disparate d'une région du monde à l'autre. Néanmoins de manière générale, la kératite à *Fusarium* est l'une des causes les plus fréquentes de kératite fongique au niveau mondial [53] [56]. Les champignons du complexe FSSC et dans une moindre mesure FOSC sont les *Fusarium* les plus fréquemment en cause.

En sus des facteurs prédisposant liés à l'hôte (cf paragraphe dédié), il convient ici d'évoquer le risque d'épidémie de kératite à *Fusarium* chez les porteurs de lentilles de contact. En 2005-2006 une épidémie de grande envergure est survenue principalement sur le continent américain. Plusieurs centaines de cas de kératite à *Fusarium* furent recensées et un lien avec les liquides de conservations des lentilles fut établi, conduisant à l'arrêt de la commercialisation de certains produits (Figure 9). L'origine exacte de l'épidémie n'est pas connue mais plusieurs hypothèses ont été émises : perte d'activité de l'agent désinfectant, croissance du champignon à la surface de la lentille (biofilm), microtraumatisme oculaire dû au port quotidien de lentilles, blocage de la réaction inflammatoire par les lentilles...[26].

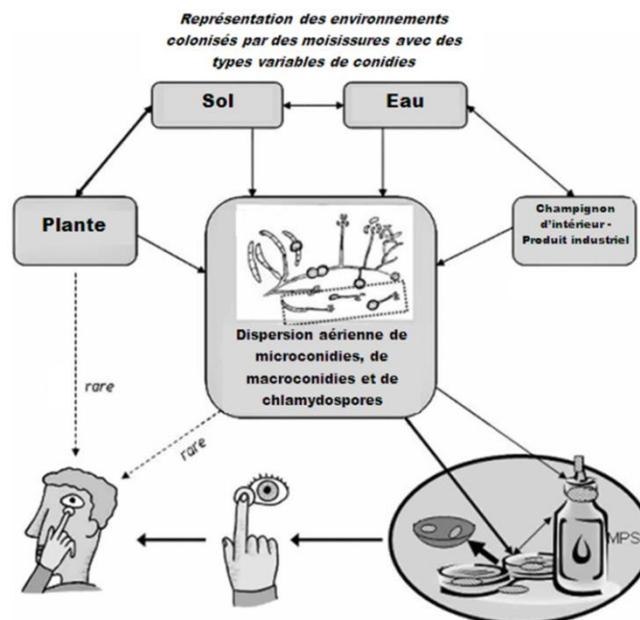


Figure 9 : Lien entre kératite à *Fusarium*, environnement et liquide de conservation de lentille d'après [26]

1.4.2.3. Infection cutanée

Deux types d'infections cutanées à *Fusarium* peuvent être observés. Les infections primitivement cutanées et les infections touchant secondairement la peau : il s'agit alors de métastases cutanées observées dans les formes disséminées de fusariose [57]. Les fusarioses cutanées primaires peuvent affecter tous types de patients y compris les patients immunocompétents. Néanmoins ces fusarioses sont retrouvées préférentiellement chez des patients à risques comme les diabétiques [58], les patients greffés (Figure 10) [57], les patients brûlés [59] ou atteints d'hémopathie (Figure 11) [60]. Ces lésions sont généralement nécrotiques et peuvent alors évoluer vers un ulcère [61].

Il est parfois délicat de différencier une véritable infection à *Fusarium*, d'une simple colonisation d'une lésion dermique préexistante. L'examen anatomopathologique du derme peut alors permettre de discriminer ces deux situations. Dans la première situation, des filaments seront observés dans l'intégralité du derme tandis que dans la seconde, les filaments ne seront observés qu'en superficie [62].



Figure 10 : Nodules cutanés à *Fusarium*, chez un patient greffé en cellules souches hématopoïétiques [57]



Figure 11 : Lésion cutanée à *F. solani* chez un patient atteint de leucémie aigue myéloïde [60]

1.4.2.4. Mycétome

Un mycétome est une pathologie rare se définissant comme une pseudo-tumeur inflammatoire localisée au niveau du tissu sous-cutané, contenant des grains fongiques ou bactériens. Cette affection est typiquement localisée au pied et évolue lentement vers une tuméfaction indolore avec fistule (Figure 12) [63].

Parmi les champignons impliqués dans les mycétomes, les *Fusarium* du complexe d'espèces FSSC sont très exceptionnellement en cause [64]. A titre d'exemple, une étude mexicaine de 2014 regroupant 482 cas de mycétome, en attribue 0.41 % aux champignons du complexe d'espèce FSSC [65].



Figure 12 : Mycétome [65]

1.4.2.5. Infections pulmonaire

Bien que beaucoup plus rare, la pathogénicité des *Fusarium* au niveau pulmonaire est à rapprocher de celle des *Aspergillus*, en incluant les manifestations broncho-pulmonaires allergiques [66], l'hypersensibilité pulmonaire [67] et la colonisation de cavité préexistante [68].

De plus, une dizaine de cas de pneumonie à *Fusarium* est rapportée dans la littérature que les patients soient immunocompétents ou non [57].

1.4.2.6. Autres infections localisées

Dans la littérature, les *Fusarium* sont exceptionnellement impliqués dans diverses pathologies.

Quelques cas de sinusite fongique à *Fusarium* ont été décrits. D'un point de vue sémiologique, les symptômes ne sont pas distinguables d'une sinusite bactérienne ou d'une sinusite aspergillaire [31]. Les *Fusarium* ont également été incriminés dans des infections

urinaires, notamment en cas de stase urinaire [69]. Des manifestations d'arthrite et d'osteomyélite ont été attribuées à des champignons du genre *Fusarium*, particulièrement en cas de fracture ouverte [70]. Enfin, de pronostic extrêmement défavorable, quelques cas d'endocardites sont rapportés dans la littérature [71].

1.4.3. Infections disséminées

Une infection disséminée se définit par l'invasion d'au moins deux sites non contigus, faisant supposer une dissémination hématogène de l'agent infectieux (objectivée ou non par des hémocultures).

Cliniquement une infection fongique disséminée à *Fusarium* se caractérise par un tableau septique persistant malgré une antibiothérapie à large spectre. Bien que toutes les localisations tissulaires soient susceptibles d'être observées, l'atteinte cutanée est prédominante (environ 80 % des cas), suivie par l'atteinte pulmonaire (30 % des cas). Lorsqu'elles sont observées, les manifestations cutanées sont multiples, parfois douloureuses et atteignent volontiers les extrémités des membres. Ces lésions apparaissent précocement, ce qui explique qu'il s'agisse fréquemment du point d'appel diagnostique [72] [73]. L'atteinte pulmonaire quant à elle, n'est pas distinguable cliniquement et radiologiquement d'une atteinte aspergillaire. La toux, la fièvre, l'hémoptysie et les douleurs thoraciques sont les principales manifestations retrouvées et il existe le plus souvent des images pulmonaires à infiltrats alvéolaires non systématisés [74].

La première description de fusariose disséminée remonte à 1973, chez un enfant présentant une leucémie aiguë [75]. Depuis lors, la littérature fait état de nombreux cas de fusariose disséminée. Les *Fusarium* étant des agents pathogènes opportunistes, les fusarioses disséminées ne sont observées que chez les patients immunodéprimés. La grande majorité de ces infections survient chez les patients atteints d'hémopathie et principalement chez ceux ayant bénéficié d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques. [73]. Plus rarement, les fusarioses disséminées atteignent les patients brûlés ou les patients transplantés. Une étude internationale rétrospective montrait que les patients atteints d'hémopathie représentent 60 % des cas de fusariose invasive, les patients greffés en cellules souches 18 % des cas, les patients en immunodépression chronique 12 % des cas et enfin les 10 % restant correspondaient à d'autres situations [76].

La proportion d'isolement des champignons du genre *Fusarium* varie selon les études et la zone géographique étudiée. A titre d'exemple, nous pouvons citer ici une étude américaine d'envergure (1208 cas d'infections fongiques invasives, 23 centres) dans laquelle le genre *Fusarium* arrive second (25 %) des cas recensés d'infection fongique non aspergillaire. Dans

une étude brésilienne, les *Fusarium* représentent 20.7 % des infections à filamenteux [77], à Taiwan et en Australie ils représentent respectivement 44.4 % [78] et 11.5 % des moisissures non aspergillaires [79]. Au global, il est communément admis que les *Fusarium* sont les seconds agents fongiques filamenteux responsables d'infections disséminées chez l'Homme, derrière les *Aspergillus* [80]

Concernant les espèces de *Fusarium* en cause, il s'agit principalement de *Fusarium solani* (22 %), suivi de *Fusarium proliferatum* et *Fusarium moniliforme* (11 % chacun) puis de *Fusarium oxysporum* (10 %) d'après l'étude rétrospective internationale [76]. Néanmoins, le pronostic de l'infection ne semble pas être lié à l'espèce, mais relève surtout de la profondeur et de la durée de la neutropénie [76].

La porte d'entrée du champignon est sujette à débat. Bien que la voie respiratoire puisse être incriminée, l'effraction cutanée semble être la principale voie d'abord du micro-organisme à l'hôte. La mise en place de cathéter [81] et la présence d'onychomycose [34] pourraient en outre être impliquées.

Point important de distinction avec les aspergilloses : les fusarioses se caractérisent par un taux élevé d'hémoculture positive, en effet dans environ un cas sur deux, une fongémie à *Fusarium* est objectivée [82]. Cette propriété s'expliquerait par l'angiotropisme des *Fusarium* associé à leur capacité à former des spores *in vivo* en anaérobiose [83].

1.5. Diagnostic d'une infection à *Fusarium*

D'une manière générale, quel que soit le type d'infection et sa localisation, des prélèvements doivent être pratiqués afin de mettre en évidence l'agent infectieux causal et ainsi documenter la pathologie. Concernant les infections à *Fusarium*, les prélèvements peuvent être de natures très diverses : prélèvement de phanères dans l'exploration des onychomycoses, grattage cornéen dans le cas de kératite, biopsie cutanée ou hémoculture.

Durant l'ensemble des processus de prise en charge des prélèvements, le personnel de laboratoire doit continuellement garder à l'esprit que les *Fusarium* sont des champignons ubiquitaires dans l'environnement. Il est donc primordial de s'appuyer sur un faisceau d'arguments clinico-biologiques afin de discriminer un *Fusarium* agent causal d'une infection d'un *Fusarium* contaminant de laboratoire.

Outre ce diagnostic mycologique, le diagnostic pourra également s'appuyer sur l'imagerie médicale en particulier en cas d'atteinte pulmonaire. Par ailleurs, concernant le suivi des patients à risques, des techniques d'immunodiagnostic ont été développées et seront abordées dans ce paragraphe.

1.5.1. Diagnostic mycologique

1.5.1.1. Examen direct

La première étape du diagnostic mycologique est l'examen direct microscopique à la recherche d'éléments fongiques. Cet examen peut relever, en France, soit d'un laboratoire de biologie médicale, soit d'un laboratoire d'anatomopathologie selon la nature du prélèvement. L'examen mycologique d'un laboratoire de biologie médicale fait appel à des colorants, tel que le noir de chlorazol ou le blankophor (Figure 13). L'examen histologique quant à lui utilise des colorations comme l'hématéine éosine, le perodic acid schiff (Figure 14) ou la coloration argentique de Gomori-Grocott [34].

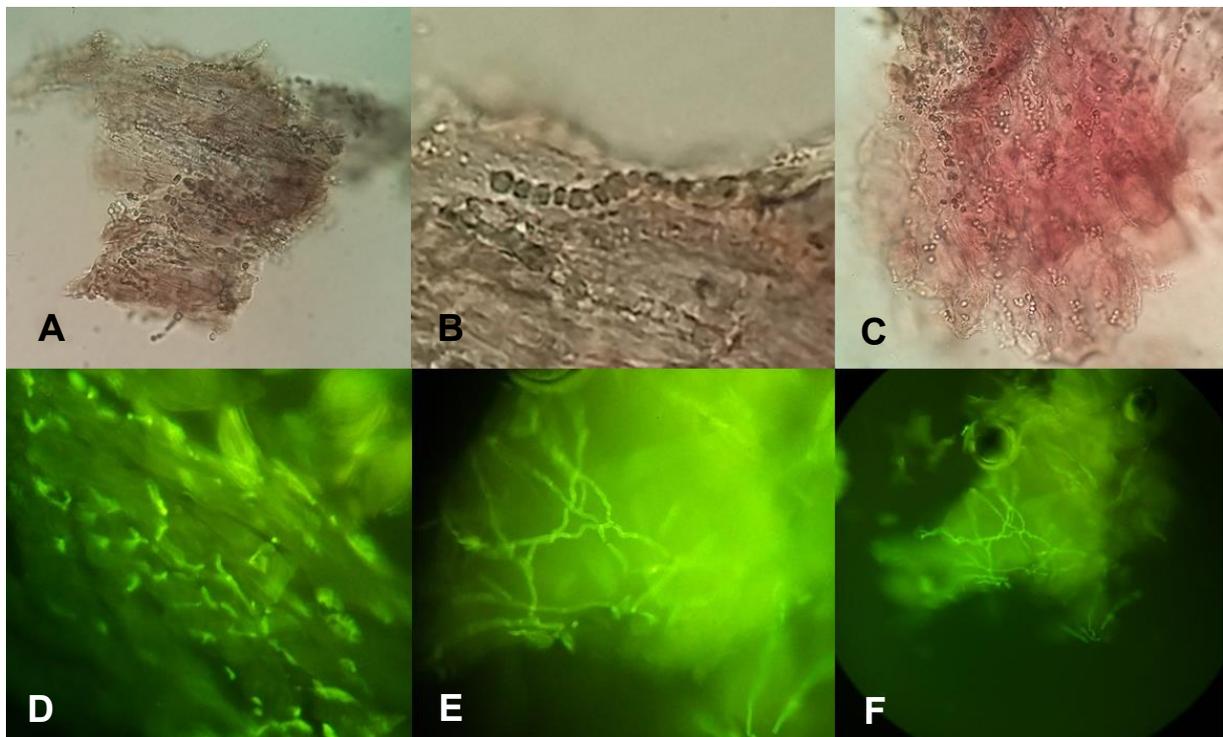


Figure 13 : Examen direct au noir de chlorazole (A-C) et au blankophor (D-F) d'un ongle d'orteil infecté par *Fusarium* (photos personnelles)

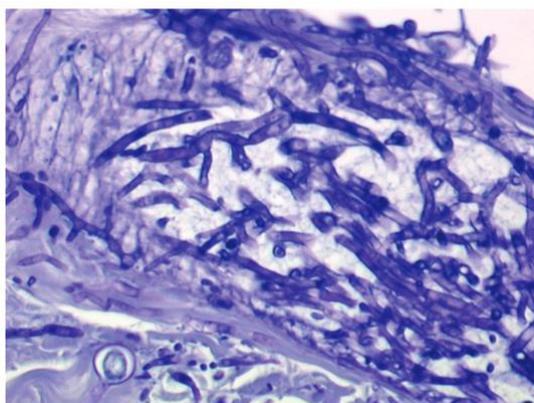


Figure 14 : Filaments de *Fusarium* colorés par le periodic acid schiff dans une coupe histologique de biopsie [34]

Quels que soient l'origine du prélèvement et le type de coloration, un examen direct positif à *Fusarium* doit retrouver des filaments hyalins septés présentant des ramifications à angles aiguës ou droits. Un tel examen direct pose alors le diagnostic de hyalo-hypho-mycose mais ne permet nullement de préjuger du genre fongique. En effet de nombreux autres champignons filamenteux présentent la même morphologie, notamment les *Aspergillus*. Il est toutefois important de noter que si une observation concomitante de spores est observée chez un patient à risque, la fusariose peut alors être d'emblée évoquée [31]. Néanmoins, seule l'utilisation en anatomopathologie d'anticorps monoclonaux spécifiques pourrait permettre le diagnostic formel du genre fongique à cette étape, cependant cette technique n'est que rarement utilisée en routine [84].

Même si l'examen direct manque de sensibilité et n'est que peu spécifique d'espèce, il est un élément important du diagnostic. Un examen direct positif à filaments est très spécifique d'une hyalo-hypho-mycose et sera un argument notable pour l'imputation pathologique d'un *Fusarium* retrouvé en culture.

1.5.1.2. Culture mycologique

En sus de l'examen direct, une culture mycologique est systématiquement réalisée. Elle consiste en un ensemencement de milieux de culture avec le prélèvement du patient. Les *Fusarium* poussent rapidement (dès 48 - 72 h) sur les milieux classiques de mycologie, notamment sur milieu de Sabouraud sans actidione (cycloheximide) à 37°C [2].

L'identification de première intention fait appel à l'examen des caractères macro et microscopiques des colonies de champignons. Le diagnostic de genre *Fusarium* est

relativement aisé mais ce n'est pas forcément le cas du diagnostic d'espèce, dont les différences culturelles sont parfois subtiles et inconstamment présentes sur milieu de Sabouraud. A titre d'illustration, nous pouvons relever le pourcentage important de souches non identifiées au niveau de l'espèce dans les publications scientifiques ; jusqu'à 38 % dans l'étude rétrospective de 2010 [36].

L'identification de certitude jusqu'à l'espèce de *Fusarium* n'étant pas toujours aisée, il convient de se poser la question de la pertinence de celle-ci. Outre l'aspect épidémiologique, l'identification de l'espèce doit être effectuée pour les infections graves, nécessitant la mise en place d'un traitement antifongique : toutes les espèces de *Fusarium* ne présentant pas la même sensibilité aux antifongiques (cf paragraphe dédié).

Plusieurs techniques peuvent permettre l'identification d'espèce. La méthode historique repose sur la description phénotypique du champignon. Si celle-ci est impossible sur milieu Sabouraud, des subcultures sur milieu *potato dextrose agar* (PDA) ou Oatmeal agar peuvent être effectuées. Ces cultures sont conservées à la lumière à 25°C et sont observées à partir d'une semaine voire plus tardivement [1] [2].

1.5.1.2.1. Aspect macroscopique

Le mycélium aérien est parfois cotonneux, les colonies présentent souvent des couleurs vives, au recto et au verso de la gélose, avec parfois des pigments diffusibles (Figure 15). Les couleurs varient avec l'espèce et le milieu de culture, les tons blanchâtres à jaunes, roses, rouges ou pourpres sont les plus fréquemment rencontrées [85] [2].



Figure 15 : Morphologie recto-verso d'espèces de *Fusarium* sur PDA [85]

A, *F. poae*. B, *F. oxysporum*. C, *F. acuminatum*. D, *F. nelsonii*. E, *F. subglutinans*. F, *F. nygamai*. G, *F. pseudonygamai*. H, *F. lateritium*. I, *F. thapsinum*. J, *F. decemcellulare*. K, *F. verticillioides*. L, *F. culmorum*

1.5.1.2.2. Aspect microscopique

L'identification phénotypique est basée sur l'observation des spores de *Fusarium*. Quatre types peuvent être observés : microconidies, macroconidies, mésoconidies (encore nommée blastoconidies) ou chlamydospores (Figure 16). Certaines espèces produisent les quatre types de structure, d'autres non.

Les macroconidies sont caractéristiques : longs fuseaux ou faucilles plurilobées (1 à 5 septa) (Figure 16 C). Elles signent l'appartenance au genre *Fusarium* mais peuvent être rares voire absentes. Leurs formes et dimensions varient en fonction de l'espèce. Elles sont parfois regroupées en sporodochium, structure correspondant à un groupement de conidiophores donnant un aspect de coussinet visible macroscopiquement.

Les conidiophores sont simples ou ramifiés, ils portent les cellules conidiogènes : les phialides. Les phialides sont de deux types soit monophialidique, avec un seul pore de bourgeonnement terminal (Figure 16 A), soit polyphialidique, avec plusieurs pores subterminaux (Figure 16 B).

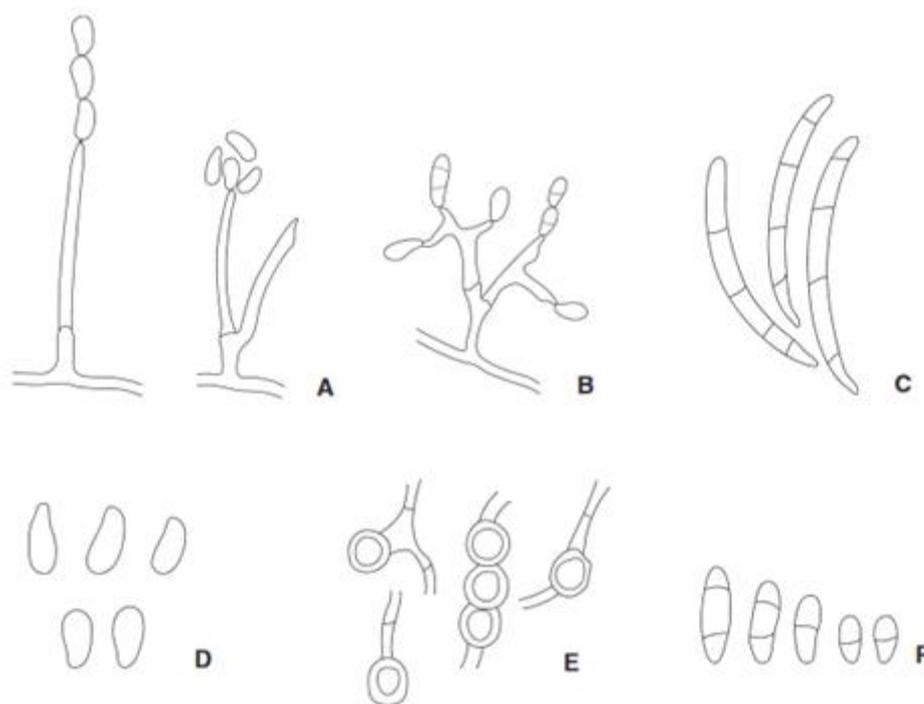


Figure 16 : Fructifications et modes de fructification de *Fusarium* (A : Monophialide, B : Polyphialides , C : Macroconidie, D : Microconidies, E : Chlamydospores, F : Mésoconidie) d'après [2]

Les microconidies (Figure 16 D) sont de formes variables (ellipsoïdes, ovoïdes...) généralement unicellulaires. Elles peuvent être agglomérées en boule à l'extrémité des phialides (mono ou polyphialides) ou plus rarement en chaînette. En l'absence de macroconidies associées, il est parfois délicat de faire la distinction avec le genre *Acremonium*.

Les mésoconidies (Figure 16 F) sont de tailles intermédiaires et sont produites par des polyphialides.

Les chlamydospores (Figure 16 E) sont des spores de survies résultant d'une transformation directe du mycélium. Elles sont latérales ou terminales, lisses ou échinulées, isolées ou en chaînettes, abondantes ou absentes selon l'espèce de *Fusarium*.

1.5.1.2.3. Algorithme d'identification phénotypique.

Afin de permettre une identification phénotypique des espèces de *Fusarium* des algorithmes sont disponibles dans la littérature. Nous proposerons ici celui de l'Atlas of clinical fungi, ouvrage de référence en mycologie. A noter que les champignons sont mis en culture sur Oatmeal agar à 24°C (Tableau IV) [1].

Tableau IV : Algorithme d'identification phénotypique des *Fusarium* d'après [1]

1.a	Colonies de moins de 2 cm de diamètre en 7 à 10 jours ; macroconidies avec 1 à 2 septa	2
1.b	Colonies de plus de 2 cm de diamètre, habituellement 4 à 8 cm en 7 à 10 jours	5
2.a	Macroconidies de plus de 55 µm de long ; chlamydospores absentes	<i>Fusarium aquaeductuum</i>
2.b	Macroconidies courtes généralement moins de 25 µm de long ; chlamydospores absentes ou présentes	3
3.a	Macroconidies très incurvées avec une pointe à l'apex ; chlamydospores présentes	4
3.b	Macroconidies légèrement incurvées avec une faible pointe à l'apex ; chlamydospores absentes	<i>Plectosporium tabacinum</i>
4.a	Cellules conidiogènes longues, étroites, souvent septées	<i>Fusarium falciforme</i>
4.b	Cellules conidiogènes courtes, gonflées, unicellulaires	<i>Fusarium dimerum</i>
5.a	Microconidies rares ou absentes ; colonies ocre à brunes ; cellules conidiogènes polyblastiques abondantes	<i>Fusarium incarnatum</i>
5.b	Microconidies nombreuses	6
6.a	Microconidies en chaînes	7
6.b	Microconidies non en chaînes	10
7.a	Microconidies uniquement portées sur des monophialides	8
7.b	Microconidies portées sur des monophialides ou des polyphialides	9
8.a	Microconidies napiformes ou en forme de citrons présentes	<i>Fusarium napiforme</i>
8.b	Microconidies napiformes ou en forme de citrons absentes	<i>Fusarium verticilloides</i>
9.a	Chlamydospores absentes	<i>Fusarium proliferatum</i>
9.b	Chlamydospores abondantes	<i>Fusarium nygamai</i>
10.a	Cellules conidiogènes polyblastiques fréquentes	11
10.b	Cellules conidiogènes polyblastiques absentes	14
11.a	Colonies rouges ; chlamydospores abondantes ; blastoconidies prédominantes	<i>Fusarium chlamydosporum</i>
11.b	Colonies roses-violettes ; chlamydospores absentes ; blastoconidies moins abondantes	12

12.a	Microconidies produites par un conidiophore prolongé sur les hyphes poussant horizontalement à la surface de la gélose, généralement non septé, obovale avec une extrémité plus étroite ellipsoïdale	<i>Fusarium sacchari</i>
12.b	Microconidies produites par un conidiophore érigé	13
13.a	Microconidies pyriformes présentes	<i>Fusarium anthophilum</i>
13.b	Microconidies pyriformes absentes	<i>Fusarium subglutinans</i>
14.a	Microconidies sur des monophialides courtes souvent latérales ; macroconidies orange en masses, sans cellule de « pied » distinctes ; colonies blanches à violettes, ou ocres à oranges lorsque les sporodochia sont présentes	<i>Fusarium oxysporum</i>
14.b	Microconidies sur des monophialides longues ; macroconidies avec cellules de « pied » indistinctes ; colonies blanches crèmes ou bleues à bleues-vertes lorsque les sporodochia sont présentes	<i>Fusarium solani</i>

Exemple d'application :

Ainsi en suivant les points 1.b → 5.b → 6.b → 10.b → 14.b de l'arbre décisionnel, l'identification phénotypique de *Fusarium solani* sera possible. Les principales caractéristiques macro et microscopique sont illustrée en Figure 17.

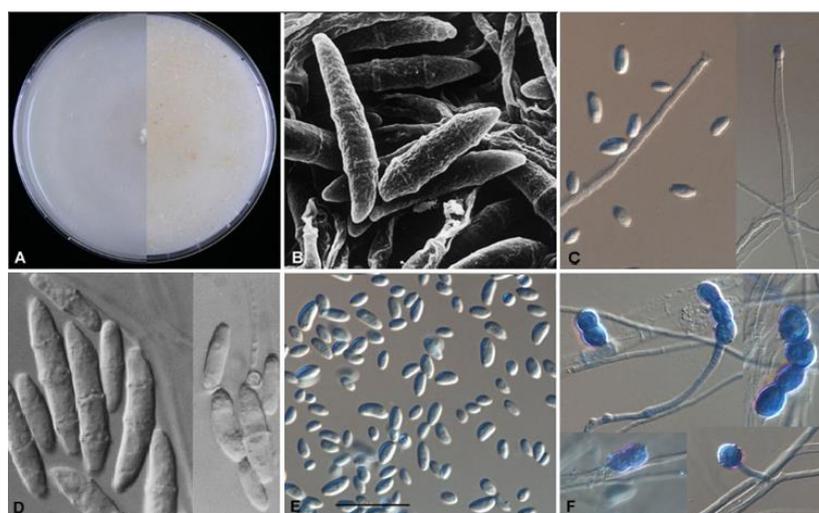


Figure 17 : Caractéristique macroscopique (A) et microscopique de *F. solani* (B, D : macroconidies, C : monophialides, E : microconidies, F : chlamydospores) d'après [1]

1.5.1.3. Identification par spectrométrie de masse

Depuis plusieurs années, se développe en microbiologie une technique rapide, simple et peu coûteuse (à l'usage) d'identification : la spectrométrie de masse dite MALDI-TOF (*Matrix assisted laser desorption ionisation- Time of fly*). Il s'agit d'une technique d'identification d'un micro-organisme réalisable après culture et permettant de remplacer les méthodes phénotypiques traditionnelles. Le point de départ est une co-cristallisation avec une matrice de l'agent biologique à identifier. L'ensemble est ensuite irradié par un laser dont la longueur d'onde correspond au spectre d'absorption de la matrice. Il en résulte une ionisation « douce » (au regard des techniques traditionnelles de spectrométrie de masse) en phase gazeuse des molécules constituant l'échantillon : les ions ainsi formés sont caractérisés par un rapport masse/charge (m/z). Ils vont ensuite être accélérés et envoyés dans un tube de « vol » sous vide où ils seront séparés en fonction de leur vitesse, donc de leur rapport m/z . L'enregistrement séquentiel de l'arrivée des ions sur le détecteur permet d'obtenir un spectre [86] (exemple Figure 18). Cette technique permet ainsi de quantifier en quelques secondes des molécules de masse comprise entre 2000 et 15000 Daltons, ce qui correspond aux protéines ribosomales et de structure du micro-organisme. Sur le principe, chaque agent biologique est constitué d'une combinaison protéique qui lui est propre et la combinaison des signaux produira donc un spectre qui lui est spécifique. Ce spectre pourra donc ensuite être comparé à une base de donnée afin d'en déduire l'identité du micro-organisme [87].

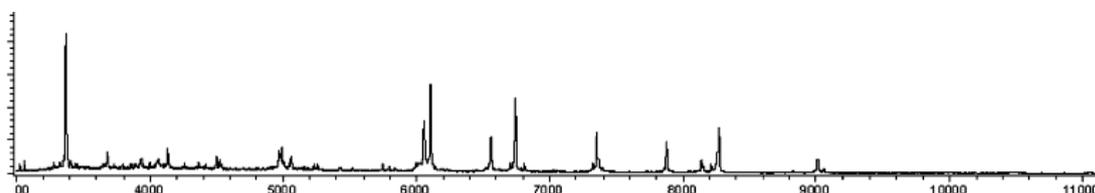


Figure 18 : Exemple de spectre de masse d'une souche de *F verticillioides* par MALDI-TOF [88]

Cette analyse a plusieurs avantages ce qui explique son essor en biologie médicale. Il s'agit tout d'abord d'une technique très rapide : quelques minutes suffisent pour l'identification (après une première culture) là où les techniques culturales pouvaient prendre plusieurs jours, notamment si des repiquages étaient nécessaires. De plus, cette technique est simple d'utilisation et nécessite un opérateur moins expérimenté que les méthodes phénotypiques pour lesquelles une expertise microscopique est indispensable. Enfin, bien que l'acquisition de l'appareil soit onéreuse (centaines de milliers d'euros), l'identification en soit n'est pas très coûteuse, puisqu'elle ne nécessite que peu de consommables (plaques de dépôts et matrice uniquement)[86]. Les inconvénients de l'identification par MALDI-TOF à

l'heure actuelle résident principalement dans le coût d'achat de l'automate, et la nécessité de constituer des bases de données exhaustives.

Concernant l'identification fongique des levures, la spectrométrie de masse est largement répandue et donne aujourd'hui de bons résultats [87]. En revanche, en ce qui concerne l'identification des champignons filamenteux et donc des champignons du genre *Fusarium*, l'identification par spectrométrie de masse n'est pas encore optimale. D'une part, l'étape de dépôt des champignons filamenteux, étape critique pour la qualité de l'identification est en générale plus délicate que pour les microorganismes unicellulaires. D'autre part, les bases de données disponibles en routine ne sont pas assez complètes pour permettre une bonne identification jusqu'à l'espèce du filamenteux étudié [87].

Plusieurs études se sont intéressées à l'identification des champignons du genre *Fusarium* par spectrométrie de masse. Cette approche donne dans l'ensemble de bons résultats et semble donc être prometteuse pour une application en routine. Deux études se sont attachées à identifier les principaux complexes d'espèces de *Fusarium* pathogènes pour l'homme par spectrométrie de masse, en utilisant comme référence des techniques de biologie moléculaire [88], [89]. Ces études montrent l'intérêt de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification des champignons du genre *Fusarium*, mais il reste maintenant à incrémenter les bases de données spectrales utilisées en routine pour une utilisation optimale en laboratoire de biologie médicale.

1.5.1.4. Identification par biologie moléculaire

Depuis la découverte du principe de PCR (*polymerase chain reaction*) dans les années 1980, les techniques de biologie moléculaire se sont très rapidement imposées dans le quotidien des laboratoires, aussi bien de recherche que d'analyses médicales. Dans un laboratoire de biologie médicale, les techniques de biologie moléculaire ont l'avantage de pouvoir intervenir aux différentes étapes de l'analyse. Elles peuvent être utilisées soit directement sur un prélèvement (pour une recherche plus ou moins orientée) soit après mise en culture du prélèvement, pour permettre l'identification du micro-organisme isolé en culture.

Dans le cas de mycoses invasives, il est désormais bien établi que le délai de diagnostic et donc de mise en place d'une thérapeutique adaptée conditionne l'évolution et le pronostic de la pathologie [90]. Il a donc été développé des techniques de PCR dites « panfongiques » réalisables directement sur le prélèvement, afin de s'affranchir du délai parfois long d'une culture traditionnelle. La cible génomique la plus utilisée est le gène codant la région ITS (*Internal transcribed spacer*)[91]. Ce gène possède plusieurs avantages : il présente des

régions hautement conservées, permettant le design d'amorces universelles, et des régions variables, permettant l'identification du champignon. De plus ce gène est multicopie (environ une centaine) ce qui permet d'augmenter la sensibilité de l'analyse. Une fois l'amplification génique par PCR effectuée, le séquençage de l'amplicon est réalisé puis l'étude bioinformatique par comparaison aux bases de données de la séquence obtenue va permettre l'identification du champignon [92]. Cette stratégie de PCR panfongique a été évaluée sur des prélèvements histologiques (frais, fixés ou paraffinés) et donne un taux de détection de 93.6 % des infections fongiques prouvées par culture *versus* seulement 64.3 % pour les examens d'anatomopathologies [92].

Néanmoins pour les champignons du genre *Fusarium* le gène ITS est trop conservé, ce qui explique que l'identification moléculaire par séquençage de ce locus sous-estime le polymorphisme et ne permet pas toujours l'identification de l'espèce de *Fusarium* [5]. Plusieurs gènes alternatifs ont donc été proposés pour l'identification précise des espèces de *Fusarium*. Actuellement le schéma d'identification le plus abouti a été proposé par O'Donnell et son équipe, il repose sur le séquençage de 3 gènes : EF1 α , RPB1 et RPB2 [1] [5].

Le gène EF1 α (*translation elongation factor 1 alpha*) code pour une partie essentielle de la machinerie protéique ; il présente un haut niveau de polymorphisme et est monocopie. A noter que le gène EF1 α s'est imposé comme le gène de choix dans les schémas d'identification de *Fusarium* n'utilisant qu'un seul locus [93] [94].

Les gènes RPB1 (*largest subunit of RNA Polymerase*) et RPB2 (*second largest subunit of RNA polymerase*) codent pour les sous unités 1 et 2 de l'ARN polymérase II, enzyme indispensable à la transcription de l'ADN [95].

L'intérêt du schéma d'identification proposé par O'Donnell réside dans la richesse des bases de données : deux bases hébergent des séquences obtenues avec ce schéma : Fusarium-ID (<http://www.fusariumdb.org/index.php>) et le CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center (<http://www.westerdijkinstituut.nl/fusarium/>).

1.5.2. Immunodiagnostic

Afin de surveiller les patients à risque de développer des mycoses invasives, des techniques d'immunodiagnostic ont été développées. Ces techniques ont l'avantage d'être peu invasives car elles sont réalisables sur un simple prélèvement veineux.

Actuellement deux analyses permettent la détection de marqueurs d'infections fongiques à *Fusarium*, les cibles étant alors des antigènes fongiques. La première analyse consiste à

détecter un constituant quasi ubiquiste des parois fongiques (exception faite de *Cryptococcus neoformans* et des Zygomycètes) : le 1,3 bêta-D-glucane. Cet antigène est libéré dans le sang lors d'infection fongique invasive et n'est pas spécifique d'un genre fongique ; il peut ainsi être détecté en cas d'infection à *Aspergillus*, *Candida*, *Acremonium*, *Trichosporon* et bien sûr à *Fusarium*. Ce test occupe une place de choix dans le diagnostic des maladies fongiques invasives (il fait en outre partie des critères biologiques de l'European Organisation for Research and Treatment of Cancer) mais souffre d'une valeur prédictive positive relativement faible, en lien avec un nombre important de situations engendrant des faux positifs (bactériémie, traitement par amoxicilline) [96] [97].

Le deuxième antigène pouvant être détecté en cas de fusariose invasive est le galactomannane. Il s'agit d'un polysaccharide libéré par certains champignons lors de leur croissance. La recherche de galactomannane est principalement utilisée pour le diagnostic d'aspergillose invasive, néanmoins le relargage de galactomannane n'est pas l'apanage exclusif des *Aspergillus*. Ainsi même si cet antigène n'est pas largement répandu comparativement au 1,3 bêta-D-glucane, il peut être retrouvé lors d'infection à *Fusarium* et *Penicillium* notamment [97] [98].

1.5.3. Imagerie médicale

En cas d'atteinte pulmonaire, il est classique dans la démarche diagnostique de recourir à des examens d'imagerie médicale.

Deux types d'examens pourront alors être utilisés, la radiographie thoracique d'une part et un scanner thoracique d'autre part. Avec la radiographie, 25 % des patients atteints de fusariose ne présenteront aucune particularité, tandis qu'avec le scanner, tous les patients présenteront un aspect anormal [99].

L'imagerie permettra alors d'évoquer une étiologie fongique (présence de masses ou nodules pulmonaires (Figure 19)) mais ne permettra pas de différencier formellement une fusariose d'une aspergillose invasive. Néanmoins une caractéristique scannographique peut orienter le clinicien sur une étiologie fusarienne : le signe du halo, élément caractéristique mais inconstamment présent lors d'une aspergillose, n'est jamais retrouvé lors de fusariose [99].



Figure 19 : Nodule sur le poumon gauche d'un patient atteint de leucémie et de fusariose invasive [57]

1.6. Stratégie thérapeutique

Le traitement des fusarioses est souvent difficile et décevant. La sensibilité ou la résistance des souches de *Fusarium* aux antifongiques ne déterminent pas l'évolution clinique d'un patient, mais il existe un lien établi entre des concentrations minimales inhibitrices (CMI) élevées et une mauvaise réponse au traitement antifongique [100]. Les *Fusarium* sont des champignons présentant naturellement des CMI élevées mais ces CMI sont variables selon l'espèce, d'où l'importance d'une identification précise (notamment par biologie moléculaire) de l'espèce de *Fusarium* en cause, dans le management du traitement des fusarioses invasives [57] [100].

Les champignons du genre *Fusarium* sont résistants à la majorité des antifongiques humains disponibles : ils sont résistants *in vitro* à la flucytosine, aux triazolés de première génération (fluconazole, itraconazole) [34] [101] et aux échinocandines [57]. Cette résistance naturelle est bien documentée et s'explique par la mutation F639Y d'une sous unité de la β glucane synthase, cible des échinocandines [102]. Les molécules parmi les plus actives sur les champignons du genre *Fusarium* sont l'amphotéricine B et le voriconazole. Les CMI généralement observées sont respectivement de 0.5-1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ et 4-8 $\mu\text{g}/\text{mL}$ [34] [103] ; ces molécules sont donc classées « intermédiaires » voire « résistantes » au regard des bornes EUCAST de *A. fumigatus* [104] (il n'existe pas de bornes propres à *Fusarium*). A noter que le posaconazole est également efficace contre les *Fusarium* et peut être utilisé en deuxième intention [105]. *Fusarium solani* présente les CMI les plus élevés, ce qui explique que cette espèce soit considérée comme la plus résistante du genre [72] [57] [79]. Une récente revue de 2013 [6] résume les CMI des principaux antifongiques sur les principales espèces de *Fusarium* (Erreur ! Source du renvoi introuvable.).

Species (n° isolates)	MIC (mg/L) ^a							
	TBF	AMB	VRC	PSC	ABC	KTC	RVC	ITC
<i>F. solani</i> (27)	>16	2.39	9.82	>16	>16	>16	>16	>16
<i>F. oxysporum</i> (28)	2.69	2.32	6.09	28.98	16.40	12.19	10.77	>16
<i>F. verticillioides</i> (24)	0.24	2.33	2.19	0.83	3.34	3.24	1.77	>16
<i>F. proliferatum</i> (9)	0.29	3.70	9.39	20.16	9.75	21.53	8.83	>16
<i>F. incarnatum</i> (9)	10.08	0.93	3.70	2.94	16	2.72	9.33	>16
<i>F. chlamydosporum</i> (8)	0.27	1.54	2.83	2.38	11.31	8.72	7.34	>16
<i>F. nygamai</i> (7)	0.34	3.28	6.56	32	9.75	21.53	8.83	>16
<i>F. dimerum</i> (7)	0.91	1.64	4	32	8.83	3.62	8.83	>16
<i>F. sacchari</i> (5)	0.14	1.52	3.03	2	6.06	18.38	5.28	>16
<i>F. thapsinum</i> (5)	0.44	2.64	2.64	>16	18.38	>16	18.38	>16
<i>F. napiforme</i> (3)	0.12	3.18	1.59	32	4	8	3.18	>16

^a Determined according to the CLSI methods, after 48 h of incubation at 35 °C

ABC albaconazole, AMB amphotericin B, ITC itraconazole, KTC ketoconazole, PSC posaconazole, RVC ravuconazole, TBF terbinafine, VRC voriconazole

Figure 20 : CMI des principaux antifongiques sur différentes espèces de *Fusarium* [6]

Des associations d'antifongiques ont été évaluées pour le complexe d'espèces *Fusarium solani*. Parmi les associations terbinafine et itraconazole ; terbinafine et voriconazole ; voriconazole et amphotéricine B, seule l'association de terbinafine et de voriconazole semble posséder une action synergique [106] [107].

1.6.1. Traitement des onychomycoses

Malgré la fréquence importante des onychomycoses, les échecs thérapeutiques sont communs (jusqu'à la moitié des cas). Les hypothèses avancées pour expliquer ces échecs sont un traitement long (souvent supérieur à une année) engendrant un défaut de compliance du patient, une mauvaise pénétration de l'agent anti-infectieux au sein de la tablette unguéale et une potentielle résistance du champignon aux antifongiques [108], résistance particulièrement importante dans le cas de *Fusarium*.

Dans la littérature, de nombreuses stratégies thérapeutiques antifongiques sont proposées afin de traiter les onychomycoses à *Fusarium*, néanmoins ces études portent bien souvent sur des petites cohortes et sur des populations particulières. De ce fait, il n'existe pas actuellement de recommandation sur le traitement des onychomycoses à *Fusarium*. Selon une étude suisse, une mycose unguéale ne répondant pas à un traitement bien conduit par terbinafine ou azolé par voie systémique est bien souvent le résultat d'une infection par moisissure et notamment par *Fusarium* ; dans cette étude il est préconisé de traiter par amphotéricine B par voie topique associé à l'avulsion de l'ongle [109]. Selon une étude italienne le traitement le plus efficace serait un vernis à 8 % de ciclopirox [110]. Et parfois, au stade de leuconychie chez un patient immunocompétent, un simple grattage peut suffire [34].

1.6.2. Traitement des kératites

Tout comme le traitement des onychomycoses à *Fusarium*, le traitement des kératites souffre de l'absence de recommandations et de consensus. Les principales molécules utilisées sont l'amphotéricine B et le voriconazole. Bien que l'amphotéricine B soit la molécule ayant la meilleure activité *in vitro*, une étude *in vivo* sur modèle animal a montré une évolution clinique comparable pour l'itraconazole, le voriconazole et l'amphotéricine B dans le traitement de kératite à *Fusarium solani* [111]. L'efficacité *in vitro* des molécules antifongiques n'est donc pas le seul paramètre à prendre en considération ; les facteurs individuels de l'hôte et les caractéristiques pharmacologiques du médicament sont également primordiales. En effet l'amphotéricine B et le voriconazole peuvent être administrés par voie locale ou générale. L'association de ces deux modes d'administrations permet d'augmenter les concentrations en principes actifs au niveau du site infectieux [112]. Par ailleurs, d'autres molécules peuvent être utilisées, seules ou en complément : il s'agit notamment de la natamycine [113] et de certains désinfectants comme des biguanides [114] ou des ammoniums quaternaires [115]. Somme toute, si le traitement médicamenteux s'avère insuffisant, il est fréquemment nécessaire de recourir à des techniques chirurgicales : kératectomie, kérateplastie voire, à l'extrême, énucléation totale [116].

1.6.3. Traitement des fusarioses localisées

Concernant les formes localisées chez les patients immunocompétents, un traitement local peut parfois être suffisant. Néanmoins une intervention chirurgicale (débridement ou détersion) peut s'avérer nécessaire. A noter qu'il est recommandé d'encadrer ce geste d'un traitement antifongique systémique dont la durée sera définie en fonction de l'évolution clinique du patient (voriconazole ou posaconazole)[117].

1.6.4. Traitement des fusarioses invasives

Le management des fusarioses invasives affectant l'immunodéprimé est complexe. A ce jour, aucune étude clinique randomisée s'attachant à comparer les différentes stratégies thérapeutiques possibles n'est disponible dans la littérature. De plus l'interprétation des résultats (succès ou échecs thérapeutiques) des études est souvent délicate : la majorité des patients se trouvant déjà sous thérapie antifongique prophylactique au moment du diagnostic.

Les données de sensibilité *in vitro* aux antifongiques révèlent des sensibilités différentes en fonctions des espèces ; globalement le genre *Fusarium* est peu sensible aux antifongiques. Néanmoins, les facteurs relatifs à l'hôte (notamment la neutropénie) semblent primer sur la

sensibilité aux antifongiques. Dans une étude sur 38 cas de fusarioses, seuls les patients retrouvant une production médullaire acceptable (13 patients) répondaient aux traitements antifongiques [118]. Ainsi, le G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) facteur de croissance hématopoïétique de la lignée granuleuse, permet dans certaines études de diminuer la durée d'aplasie et à ce titre d'augmenter les chances de guérison [119].

Bien que l'analyse de la littérature ne permette pas de dégager formellement une stratégie thérapeutique optimale, en 2014 les premières (et uniques) recommandations de sociétés savantes sont parues. Il s'agit des recommandations de l'ESCMID (Société européenne pour la microbiologie clinique et les maladies infectieuses) et de l'ECMM (European confederation of medical mycology). Chacune des thérapeutiques (chimiothérapie, chirurgie...) envisagées sont caractérisées selon deux critères : le degré de recommandations par la société savante, de A (fortement recommandée) à D (non recommandée) et le degré de preuves existantes, du niveau I (au moins une étude randomisée, n'existant pas pour les fusarioses) au niveau III (opinion des autorités respectées, expérience clinique, case-report ou rapports de comités d'experts).

A propos de la chimiothérapie antifongique, les experts recommandent à titre indicatif (niveau C III) la détermination des CMI, principalement pour des raisons épidémiologiques et pour des cas particuliers de management de l'antifongithérapie. Concernant les molécules antifongiques à utiliser, le voriconazole apparaît être la molécule recommandée en première intention quel que soit le complexe d'espèce de *Fusarium*, suivi de l'amphotéricine B sous forme liposomale. Ces recommandations figurent en Tableau V.

Tableau V : Recommandations de traitement antifongique des fusarioses invasives selon l'ESCMID/ECMM d'après [105]

	Degrés de recommandation	Degrés de preuve	Commentaires
Première ligne de traitement			
Voriconazole	A	II	Dosages sériques recommandés. Taux de réponse fonction de la pathologie sous-jacente et du site d'infection
Amphotéricine B liposomale	B	II	Certaines souches peuvent être résistantes à l'amphotéricine B
Amphotéricine B lipide complex	C	II	Peu de cas cliniques rapportés
Déoxycholate d'amphotéricine B	D	II	Toxicité importante
Echinocandines	D	III	Intrinsèquement résistant
Associations d'antifongiques	C	III	Peu de cas cliniques rapportés. Association non supérieure au voriconazole seul
Traitement de sauvetage			
Posaconazole	A	II	Taux de succès 50 %. Dosages sériques recommandés
Voriconazole	A	III	Efficacité substantielle. Dosages sériques recommandés

En pratique courante, une étude rétrospective multicentrique de 2010 pourtant sur 73 cas de fusariose invasive, montrait que le voriconazole était déjà la molécule la plus utilisée (78 % des patients). Le taux de réponse constaté était alors de 47 %, sans différence significative entre un traitement primaire ou de sauvetage par le voriconazole [76].

En sus du traitement médicamenteux, les experts recommandent fortement le débridement des tissus infectés (A III) et le retrait des cathéters impliqués (A II). A contrario dans ces recommandations, l'intérêt des facteurs de croissance hématopoïétiques n'est pas formellement établi (niveau C III) (Tableau VI)[105].

Tableau VI : Recommandations de traitements adjuvants des fusarioses invasives selon l'ESCMID/ECMM d'après [105]

Population	Thérapeutique	Degrés de recommandation	Degrés de preuve
Patients d'hématologie, neutropéniques ou cancéreux	Transfusion de polynucléaire (avec prudence si greffe allogénique de cellule souche hématopoïétique indiquée)	C	III
Leucémie aigue	Débridement chirurgical (infection localisée)	A	II
Patients greffés moelle osseuse	Débridement chirurgical (infection localisée)	A	II
Autre population	Débridement chirurgical	A	III

Il est intéressant de noter que ces recommandations diffèrent des propositions de Nucci et Anaissie de 2007 qui prévalaient jusqu'alors [31]. Tout comme les recommandations de 2014, la chirurgie de débridement et le retrait de cathéter avaient une place centrale. Néanmoins, en ce qui concerne le traitement antifongique, l'établissement des CMI était encouragé et la molécule antifongique utilisée était dépendante du complexe d'espèce de *Fusarium* (pour *Fusarium solani* SC et *Gibberella fujikuroi* SC : forte dose d'amphotéricine B, pour les autres complexes : forte dose d'amphotéricine B ou de voriconazole). Concernant l'immunothérapie, ce volet était central et dépendant de la neutropénie du patient (patients neutropéniques : facteurs de croissance (G-CSF ou GM-CSF) voire transfusions de polynucléaires ; patients non neutropéniques : interférons gamma et/ou GM-CSF).

2. Etude épidémiologique au CHRU de Nancy de 2007 à 2016

2.1. Introduction

2.1.1. Présentation de la structure

La structure de Parasitologie-Mycologie est l'une des composantes du Laboratoire de Biologie Médicale du CHRU de Nancy. L'intégralité de son activité est aujourd'hui située sur le site de Brabois à Vandœuvre les Nancy. La structure est divisée en deux unités fonctionnelles (UF) : l'UF 3152 d'une part, regroupant les activités de dermatomycologie (prélèvements de peau et phanères) et l'UF 3151 d'autre part, regroupant la parasitologie et l'essentiel de la mycologie (tous types de prélèvements hors dermatomycologie). La structure de parasito-mycologie est pourvue d'une équipe de 5 biologistes (1.7 équivalent temps plein (ETP), partagés avec les plateformes d'immunodiagnostic (PFID) et de génomique microbienne (PFGM) et de 5 techniciennes de laboratoire (4.1 ETP) exclusivement affectées à la structure. L'organigramme (Figure 21) reprend l'organisation générale de ladite structure.

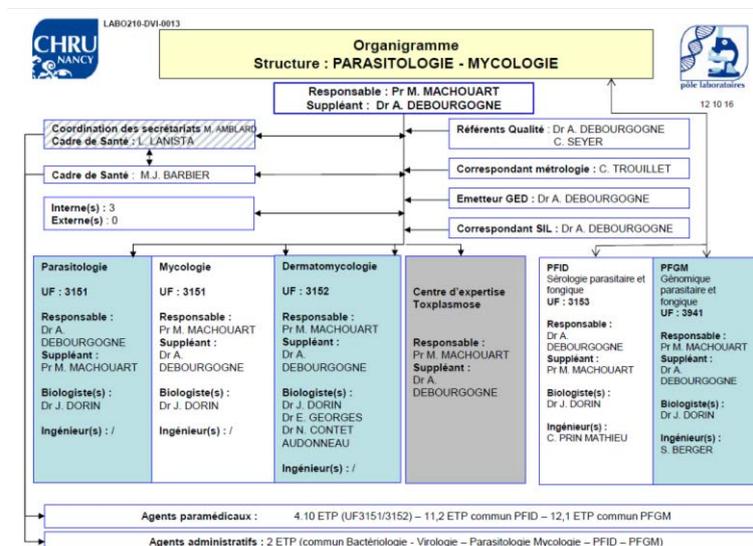


Figure 21 : Organigramme de la structure de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Nancy

La subdivision en deux UF s'explique par l'organisation historique de la structure. Avant 2011, l'UF 3152 était située sur le site urbain de Villemin-Maringé-Fournier, au centre-ville de Nancy, dans le même bâtiment que le service de dermatologie. Y était réalisée une activité de prélèvement ainsi que l'ensemble des processus analytiques relatif aux prélèvements de

peau et phanères ; qu'ils soient prélevés au laboratoire, au CHRU ou par des dermatologues extérieurs. En septembre 2010, l'UF 3152 a suivi le service de dermatologie sur le site de Brabois. Les activités analytiques des UF 3151 et 3152 ont fusionné et une antenne de prélèvement a été ouverte à proximité des consultations de dermatologie. L'UF 3151 ne présente pas d'activité de prélèvements, ceux-ci étant effectués par les services cliniques et envoyés au laboratoire pour analyse. L'UF 3151 prend en charge tous les types de prélèvements hors peau et phanère et présente de fait une grande diversité de type de prélèvement (hémoculture, digestif, oculaire ...).

2.1.2. Objectifs de l'étude :

Dans l'idée d'établir un état des lieux de l'épidémiologie de *Fusarium* au CHRU de Nancy, les objectifs de cette étude épidémiologique ont été multiples :

- Décrire l'évolution du nombre d'isolements à *Fusarium* ; nombre brut et pondéré par l'activité de la structure
- Décrire la représentativité de *Fusarium* dans les principaux tableaux cliniques où il est pathogène : fongémie, atteinte ophtalmique, atteinte des phanères
- Décrire la nature des prélèvements positifs à *Fusarium*
- Décrire les espèces de *Fusarium* en cause

2.2. Matériel et méthode

2.2.1. Indicateurs

Afin d'éviter l'apparition de biais portant sur l'activité générale du laboratoire, nous avons eu recours à trois indicateurs : le nombre de prélèvements (tous types confondus) pris en charge au laboratoire, le nombre de cultures positives (tous champignons confondus), et l'incidence du principal dermatophyte isolé (exclusivement au sein de l'UF 3152) : *Trichophyton rubrum*. Ces indicateurs ont permis de pondérer l'évolution des incidences de *Fusarium* avec l'activité de la structure.

2.2.2. Recueil de données

Depuis 2007, un système d'informatique de laboratoire (SIL) commun à la plupart des structures du laboratoire de biologie médicale du CHRU de Nancy a été mis en service. L'intégralité des examens réalisés par la structure de parasitologie-mycologie sont enregistrés dans ce SIL. L'exploitation de ce logiciel a permis l'extraction des données pour cette étude épidémiologique. Il s'agit du logiciel Glims V.8.11.6.

L'extraction de données du SIL permet l'établissement de listes de données répondant aux requêtes émises par l'utilisateur. Ces listes ont été ensuite transférées dans Excel pour y être exploitées et interprétées. Les requêtes émises par l'utilisateur ont été :

- Isolement de *Fusarium* par espèce, par nature de prélèvement, par UF et par année
- Nombre de prélèvements pris en charge par UF et par année
- Nombre de cultures positives par UF et par année
- Isolement de *T. rubrum* au sein de l'UF 3152 par année.
- Nombre d'hémocultures positives par année
- Nombre de prélèvements ophtalmologiques positifs par année
- Nombre de prélèvements de phanères (pied et main) positifs par année

2.2.3. Interprétations statistiques

Statistiques descriptives :

Pour chaque paramètre, la moyenne (m), l'écart-type (ET) et le coefficient de variation (CV) seront calculés. Au sein d'une série, un point qui s'écarte de la moyenne de plus de deux fois l'écart type sera considéré comme s'écartant significativement de la moyenne (en postulant l'hypothèse d'une distribution normale, statistiquement 95 % des valeurs d'une distribution sont comprises entre $m-2ET$ et $m+2ET$).

Test statistique :

Afin de déterminer une tendance dans l'évolution d'un paramètre, le test de Mann-Kendall est appliqué. Il s'agit d'un test non paramétrique permettant la recherche de tendance identifiable dans une série temporelle. L'hypothèse nulle de départ est H_0 : Il n'y a pas de tendance dans la série. Le niveau de risque choisi est de 5 %. Dans un premier temps, le test est réalisé avec l'hypothèse alternative H_a : Il existe une tendance dans la série (test bilatéral). Si une tendance est repérée, le test est alors répété en changeant l'hypothèse alternative. L'hypothèse est alors H_a : il existe une tendance négative (ou positive) dans la série (test unilatéral). Pour chaque test la p-value est calculée de manière exacte et sera comparée au niveau de signification. Si la p-value calculée est supérieure au niveau de signification $\alpha = 0.05$, l'hypothèse nulle H_0 est acceptée, sinon la p-value calculée étant inférieure au niveau de signification $\alpha = 0.05$, l'hypothèse nulle H_0 est rejetée, et l'hypothèse alternative H_a est retenue : une tendance sera donc montrée.

Par exemple une p-value de 0.90 signifie que le risque de rejeter H_0 alors que H_0 est vrai est de 90 %, l'hypothèse H_0 est donc retenue. Une p-value à 0.001 signifie que le risque de rejeter H_0 alors que H_0 est vrai est de 0.1 %, dans ce cas l'hypothèse H_a est retenue.

A noter qu'une série minimale de 4 années consécutives est nécessaire afin de réaliser le test.

L'ensemble des tests de Mann-Kendall ont été réalisés avec le logiciel XLSTAT 2017.

2.3. Résultats

2.3.1. Evolution de l'isolement de *Fusarium sp*

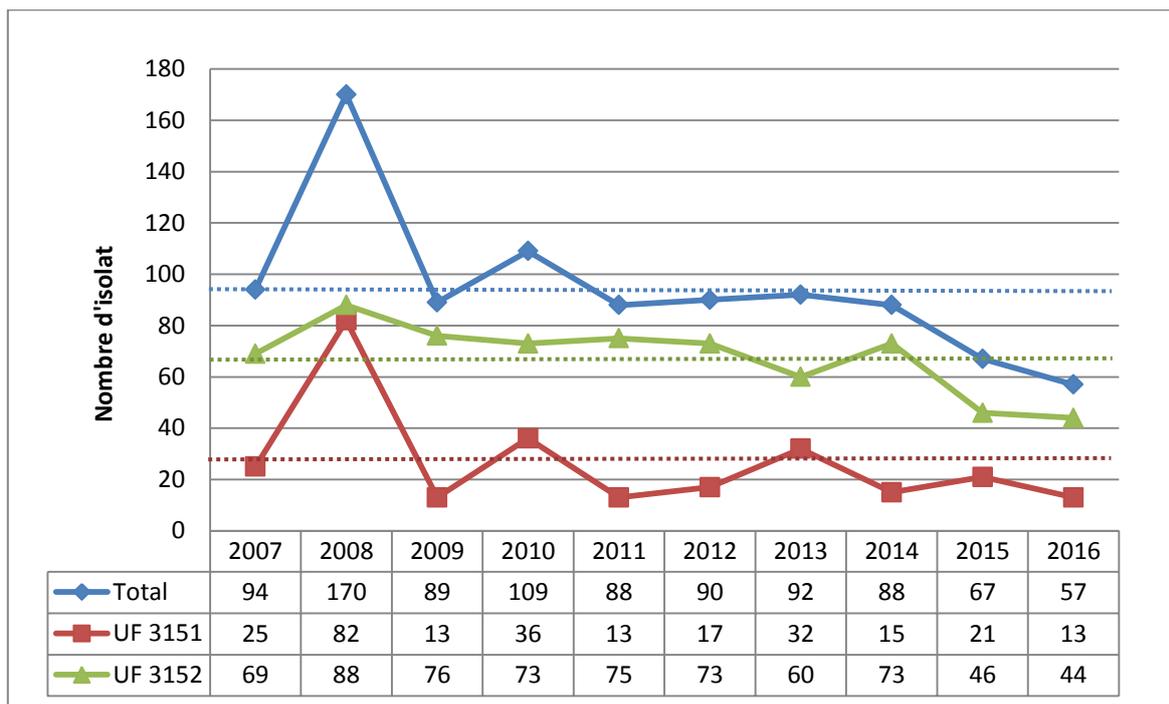


Figure 22 : Isolement de *Fusarium sp* (en bleu au sein de la structure, en rouge pour l'UF 3151, en vert pour l'UF 3152, en pointillé les moyennes respectives)

Sur toute la durée de l'étude 2007-2016 :

- Pour l'ensemble de la structure de Parasitologie-Mycologie (SPM) : 944 *Fusarium*, toutes localisations confondues, ont été isolés ; $m = 94.40$ /an, $ET = 30.21$, $CV = 32.00$ %.
- Pour l'UF 3151 : 267 *Fusarium* ont été isolés ; $m = 26.70$ /an, $ET = 21.09$, $CV = 78.98$ %.
- Pour l'UF 3152 : 677 *Fusarium* ont été isolés ; $m = 67.70$ /an, $ET = 13.79$, $CV = 20.37$ %.

Particularité de l'année 2008 :

- Pour la totalité de la structure: seule l'année 2008, s'écarte significativement de la moyenne annuelle (> 2 ET) la différence entre 2008 et la moyenne étant de 75.60 soit 2.50 ET.
- Pour l'UF 3151 : seule l'année 2008, s'écarte significativement de la moyenne annuelle (> 2 ET) la différence entre 2008 et la moyenne étant de 55.30 soit 2.62 ET.
- Pour l'UF 3152 : aucune année ne s'écarte de la moyenne de plus de 2 ET.

Le pic du nombre d'isolement observé en 2008 a été étudié. Celui-ci s'expliquant principalement par la présence au CHRU d'un patient atteint de la maladie de Wolman, alors âgé de 1 an. Il s'agit d'une maladie congénitale rare caractérisée par une mutation récessive du gène *LIPA* engendrant un déficit complet en lipase acide lysosomale. En temps normal, cette enzyme joue un rôle clé dans l'hydrolyse lysosomale du cholestérol estérifié et des triglycérides d'origine lipoprotéinique. Ainsi dans la maladie de Wolman, il se produit une accumulation de cholestérol estérifié et de triglycérides dans les tissus, engendrant dès les premières semaines de vie des troubles digestifs (vomissements et diarrhée avec stéatorrhée), une hépato-splénomégalie majeure et un retard staturo-pondéral associé à des troubles du développement psychomoteur. Il est à noter que la présence de calcifications des surrénales, révélées à la radiographie ou au scanner, est un signe quasi constant et pathognomonique de la maladie. Le myélogramme montre l'existence d'histiocytes spumeux et le frottis sanguin montre quant à lui, des vacuoles lipidiques intra-lymphocytaires. En l'absence de prise en charge médicale, le décès survient généralement dans la première année de vie. Le seul traitement efficace à l'heure actuelle est la greffe de moelle osseuse. En attendant, des traitements symptomatiques à base d'hypolipémiant (cholestyramine, statine) associés à une nutrition entérale par lait pauvre en triglycérides à chaînes longues mais riche en triglycérides à chaînes moyennes sont à mettre en place [120]. L'enfant en question est né de parents consanguins, la fratrie est saine. Il a pu bénéficier le 24 janvier 2008 d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques non apparentées 10/10 après un conditionnement par busiluef, fludarabine et sérum antilymphocytaire. Le premier isolement de *Fusarium* remonte au 10 janvier 2008, avec une présence conjointe de *Candida tropicalis*, dans un prélèvement de selle. Dans le cadre du management de la greffe de moelle osseuse, de nombreux autres prélèvements mycologiques systématiques furent effectués (digestif haut-bas et ORL). Sur l'année 2008 plus d'une centaine de séries de prélèvements ont été réalisés ; *Fusarium* fut de loin le genre fongique le plus fréquemment isolé et représente en tout 56 isolats (le dernier remontant au 15 septembre 2008). A noter que l'espèce de *Fusarium* en cause ne fut jamais déterminée. Pour le suivi du patient greffé, la recherche des antigènes galactomanane est également recommandée ; ainsi au cours de

l'année 2008, 83 bilans sanguins furent effectués avec un seul prélèvement faiblement positif le 27 mars 2008. A cette même date, seul un *Fusarium* fut isolé, dans un prélèvement buccal et justifia la réalisation d'un antifongigramme. Néanmoins aucun prélèvement profond n'a retrouvé la présence de *Fusarium* et les antigènes galactomanane du 28 mars ainsi que la procalcitonine et la CRP étaient négative. Il ne semble donc pas y avoir eu de fusariose disséminée chez ce patient. A ce jour, l'enfant fait l'objet d'un suivi annuel au CHRU et à l'exception d'une malformation du thorax en carène asymétrique, l'évolution est favorable.

Correction du biais de 2008 pour la recherche de tendance :

L'année 2008 étant surévaluée par le portage chronique de *Fusarium* par un seul patient, nous avons choisi ici de corriger ce biais par le retranchement du nombre d'isolat imputable à ce patient aux isolements totaux de l'année. Ainsi pour 2008 le nombre isolat corrigé est de $170-56 = 114$ pour l'ensemble de la structure et de $82-56 = 26$ pour l'UF 3151. Les isolements de l'UF 3152 demeurent inchangés.

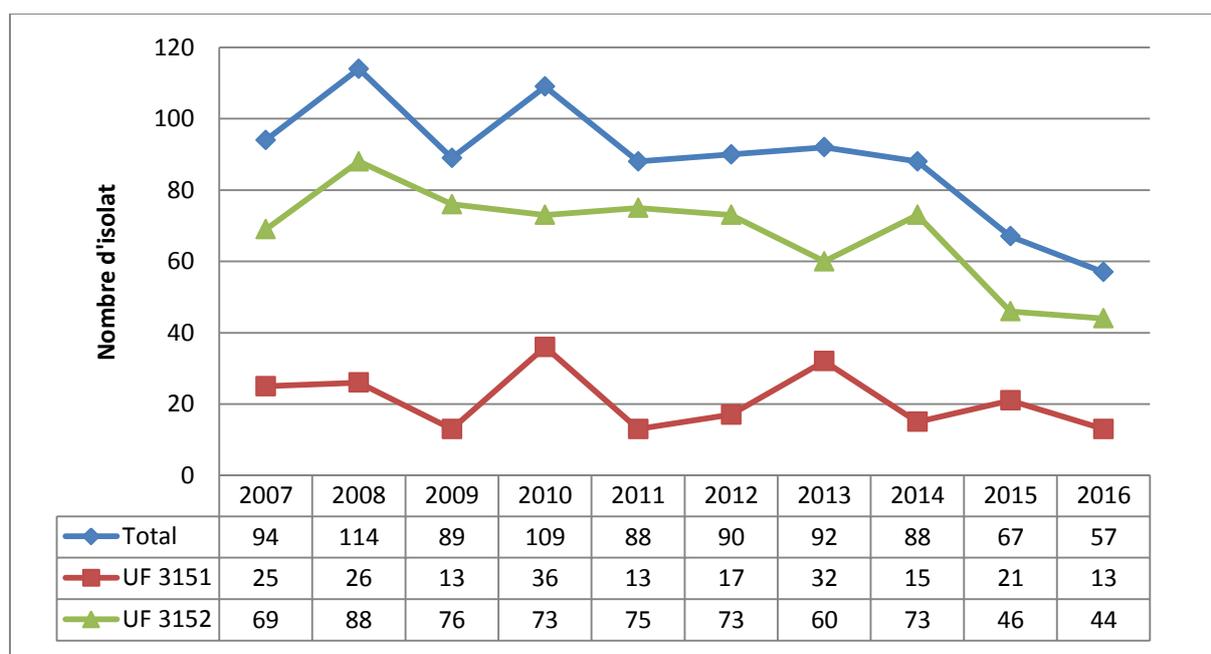


Figure 23 : Isolement de *Fusarium sp.* après correction de 2008 (en bleu au sein de la structure, en rouge pour l'UF 3151, en vert pour l'UF 3152)

Recherche de tendance sur toute la durée de l'étude 2007-2016 :

- Pour la SPM : Il existe une tendance négative, p-value = 0.008.
- Pour l'UF 3151 : Pas de tendance identifiable, p-value = 0.525.
- Pour l'UF 3152 : Il existe une tendance négative, p-value = 0.012.

Recherche de tendance : Période 2007-2014 :

- Pour la SPM : Pas de tendance identifiable, p-value = 0.212.
- Pour l'UF 3151 : Pas de tendance identifiable, p-value = 0.999.
- Pour l'UF 3152 : Pas de tendance identifiable, p-value = 0.308.

Recherche de tendance : Période 2014-2016 :

L'échantillon étant < 4, le test de Mann-Kendall n'est pas réalisable.

- Pour la SPM : depuis 2014, le nombre d'isolat de *Fusarium* est en décroissance : 88 en 2014, 67 en 2015, 57 en 2016 soit une baisse de 35.23 %. A noter que les chiffres de 2015 et 2016 sont les plus faibles de l'étude.
- Pour l'UF 3151 : Pas de tendance observable, 15 en 2014, 21 en 2015 et 13 en 2016.
- Pour l'UF 3152 : depuis 2014, le nombre d'isolat de *Fusarium* est en décroissance : 73 en 2014, 46 en 2015, 44 en 2016 soit une baisse de 39.73 %. A noter que les chiffres de 2015 et 2016 sont les plus faibles de l'étude.

2.3.2. Représentativité des deux UF dans l'isolement de *Fusarium*

Tableau VII : Représentativité des deux UF dans l'isolement de *Fusarium*

Année	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
UF 3152	73,40 %	51,76 %	85,39 %	66,97 %	85,23 %	81,11 %	65,22 %	82,95 %	68,66 %	77,19 %
UF 3151	26,60 %	48,24 %	14,61 %	33,03 %	14,77 %	18,89 %	34,78 %	17,05 %	31,34 %	22,81 %

Sur la durée de l'étude, 71.72 % des *Fusarium* isolés l'ont été au sein de l'UF 3152. La moyenne des pourcentages d'isolement de *Fusarium* au sein de l'UF 3152 est de 73.79 % (ET = 10.78, CV = 14.61 %). Seule l'année 2008 s'écarte significativement de la moyenne : la différence entre 2008 et la moyenne est de 22.03 % soit 2.04 ET. (Tableau VII).

2.3.3. Evolution de l'activité de la structure de parasitologie-mycologie

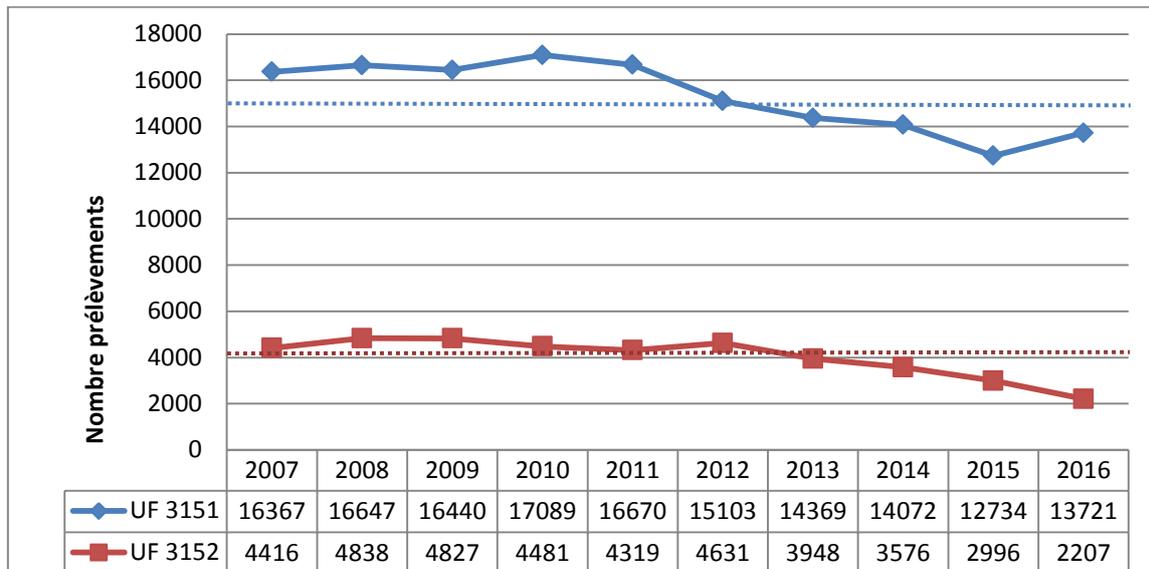


Figure 24 : Evolution du nombre de prélèvements au sein des deux UF (en bleu UF 3151, en rouge UF 3152, en pointillé les moyennes respectives)

Sur toute la durée de l'étude 2007-2016 :

- Concernant l'UF 3151 : 15321.2 prélèvements sont pris en charge en moyenne chaque année (ET = 1520.84, CV = 9.93 %). Aucune année ne s'écarte de plus de 2 ET. De plus, le test de Mann-Kendal montre une tendance négative, p-value = 0.01.
- Concernant l'UF 3152 : 4023.9 prélèvements sont pris en charge en moyenne chaque année (ET = 862.18, CV = 21.43 %). Seule l'année 2016 s'écarte significativement de la moyenne. La différence entre 2016 et la moyenne étant de 1816.9 soit 2.11 ET. De plus, le test de Mann-Kendal montre une tendance négative, p-value = 0.002.

Sur la première partie de l'étude :

- Pour l'UF 3151 de 2007 à 2011 : Pas de tendance identifiable, p-value = 0.221.
- Pour l'UF 3152 de 2007 à 2012 : Pas de tendance identifiable, p-value = 0.707.

Sur la deuxième partie de l'étude :

- Pour l'UF 3151 de 2011 à 2015 : une baisse du nombre de prélèvements de 23.61 % est enregistrée. De plus il est montré une tendance négative, p-value = 0.014.
- Pour l'UF 3152 de 2012 à 2016 : une baisse du nombre de prélèvements de 52.34 % est enregistrée. De plus il est montré une tendance négative, p-value = 0.014.

Particularité de 2016 :

Concernant exclusivement l'UF 3151, une remontée de l'activité est observé pour l'année 2016 : 12734 prélèvement en 2015, 13721 en 2016 soit une hausse de 7.75 % (Figure 24).

2.3.4. Evolution des isollements de *Fusarium* au regard de l'activité du laboratoire

2.3.4.1. Concernant l'ensemble de la structure de Parasitologie-Mycologie

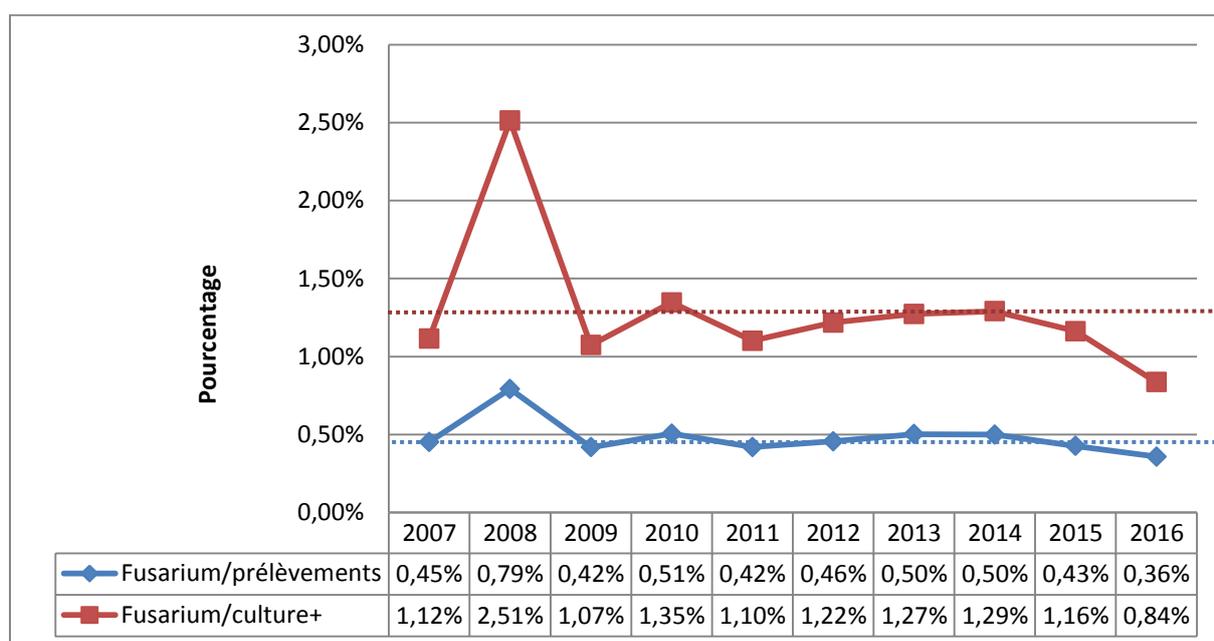


Figure 25 : Evolution de la proportion de *Fusarium sp* dans la structure au regard de l'activité (en bleu le nombre de *Fusarium*/nombre total de prélèvement pris en charge exprimé en pourcentage, en rouge le nombre de *Fusarium*/nombre de culture positive exprimé en pourcentage, en pointillé les moyennes respectives.)

Sur toute la durée de l'étude 2007-2016, en moyenne un *Fusarium* sera isolé dans 0.48 % (ET = 0.12, CV = 24.41 %) des prélèvements pris en charge dans la structure et dans 1.29 % (ET = 0.45, CV = 34.96 %) des cultures positives.

Seule l'année 2008 s'écarte significativement de la moyenne : la différence entre 2008 et la moyenne est de 0.31 % soit 2.58 ET pour le ratio *Fusarium*/prélèvements ; et de 1.22 % soit 2.71 ET pour le ratio *Fusarium*/ culture+.

Correction du biais de 2008 pour la recherche de tendance :

L'année 2008 étant surévaluée par le portage chronique de *Fusarium* par un seul patient, nous avons choisi ici de corriger ce biais par le retranchement du nombre d'isolat imputable à ce patient aux isolements totaux de l'année

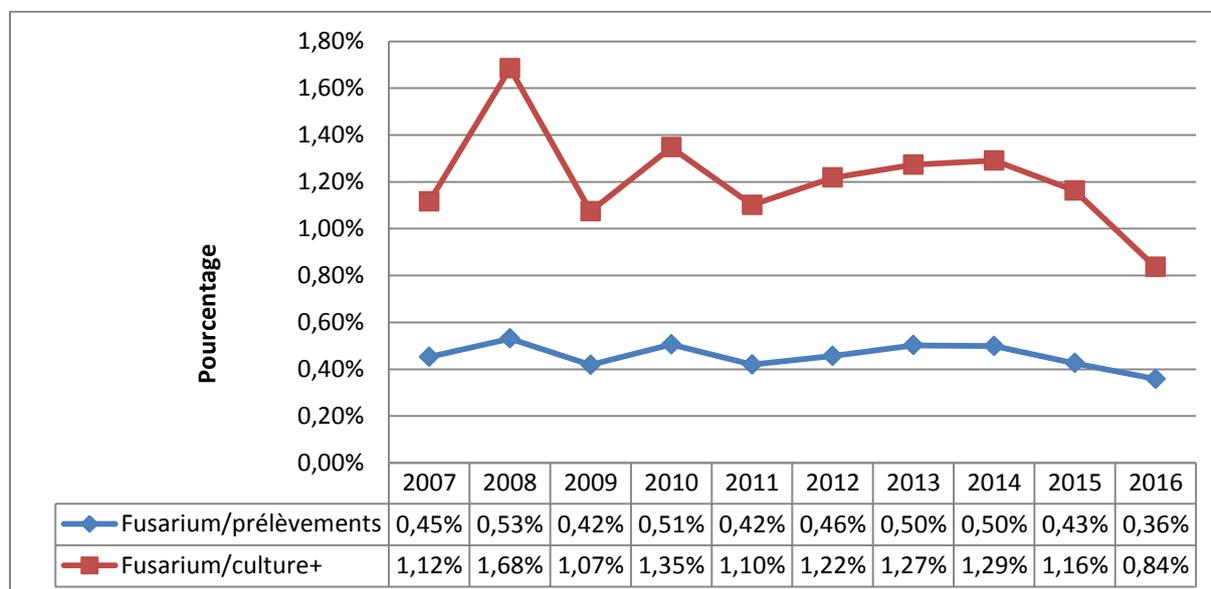


Figure 26 : Evolution de la proportion de *Fusarium sp* dans la structure au regard de l'activité après correction de 2008 (en bleu le nombre de *Fusarium*/nombre total de prélèvement pris en charge exprimé en pourcentage, en rouge le nombre de *Fusarium*/nombre de culture positive exprimé en pourcentage)

Recherche de tendance sur toute la durée de l'étude 2007-2016 :

Concernant le pourcentage de prélèvements positifs à *Fusarium* : pas de tendance identifiable, p-value = 0.371.

Concernant le pourcentage de cultures positives à *Fusarium* : pas de tendance identifiable, p-value = 0.592.

A noter que 2016 est l'année de la plus faible proportion d'isolement de *Fusarium* dans la structure de parasitologie-mycologie du CHRU de Nancy. Ainsi pour la première fois moins de 0.4 % des prélèvements pris en charge dans la structure et moins de 1 % des prélèvements positifs ont permis l'isolement d'un *Fusarium* (Figure 25).

2.3.4.2. Concernant uniquement l'UF 3152

UF 3152 étant à la fois l'UF qui permet d'isolement de la majeure partie des *Fusarium* de la structure et étant la seule qui montre une tendance négative de l'incidence des isolements, une attention particulière y a été apportée.

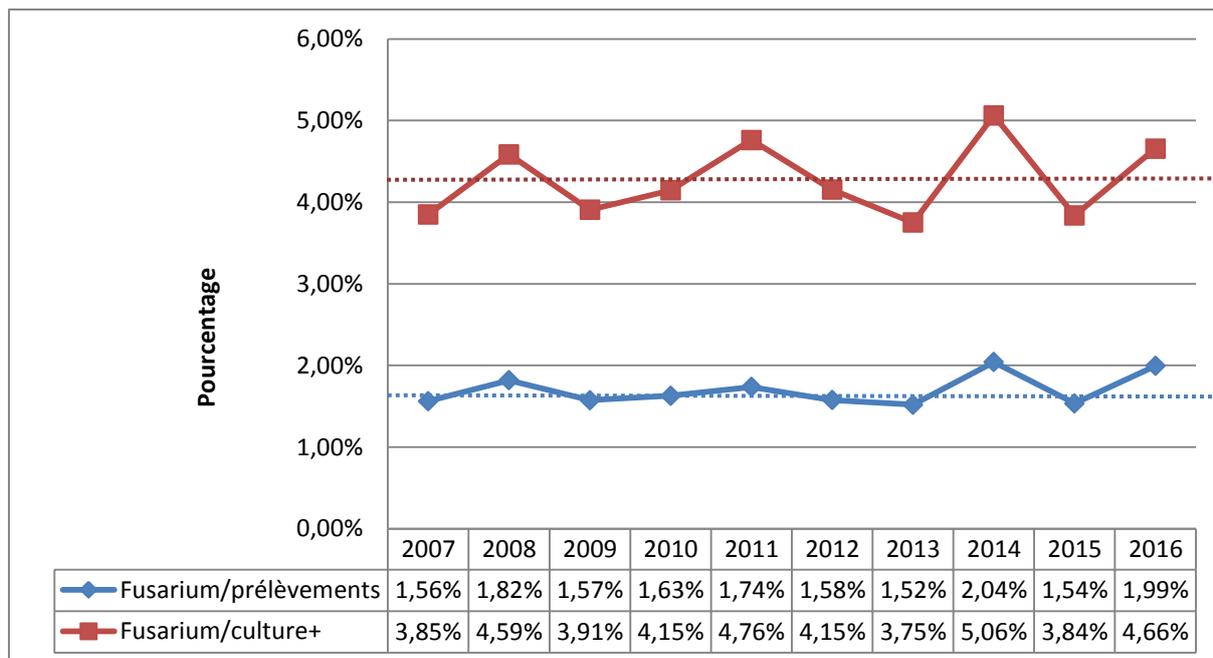


Figure 27 : Evolution de la proportion de *Fusarium* sp au regard de l'activité au sein de l'UF 3152 (en bleu le nombre de *Fusarium*/nombre total de prélèvement pris en charge exprimé en pourcentage, en rouge le nombre de *Fusarium*/nombre de culture positive exprimé en pourcentage)

Sur toute la durée de l'étude 2007-2016, en moyenne un *Fusarium* sera isolé dans 1.70 % (ET = 0.19, CV = 11.32 %) des prélèvements pris en charge dans la structure et dans 4.27 % (ET = 0.46, CV = 10.80 %) des cultures positives. Aucune année ne s'écarte de plus de 2 ET de la moyenne.

Recherche de tendance sur toute la durée de l'étude 2007-2016 :

Concernant le pourcentage de prélèvements positifs à *Fusarium* : pas de tendance identifiable, p-value = 0.721.

Concernant le pourcentage de cultures positives à *Fusarium* : pas de tendance identifiable, p-value = 0.592.

2.3.5. Evolution des isollements de *Fusarium* au regard de l'isolement de *T. rubrum* au sein de l'UF 3152.

Tableau VIII : Evolution du nombre de *Fusarium* et de *T. rubrum* isolé au sein de l'UF 3152

Année	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015	2016
<i>Fusarium</i> sp	69	88	76	73	75	73	60	73	46	44
<i>T. rubrum</i>	604	641	760	683	527	643	547	475	366	316
ratio : <i>T.rubrum/Fusarium</i>	8,8	7,3	10,0	9,4	7,0	8,8	9,1	6,5	8,0	7,2

Sur toute la durée de l'étude 2007-2016, le ratio *T.rubrum/Fusarium* est en moyenne de 8.20 (ET = 1.17, CV = 14.24%). Aucun point ne s'écarte de plus de 2 ET (Tableau VIII).

Recherche de tendance sur toute la durée de l'étude 2007-2016 :

Pas de tendance identifiable, p-value = 0.283

2.3.6. Représentation de *Fusarium* dans les principaux tableaux cliniques

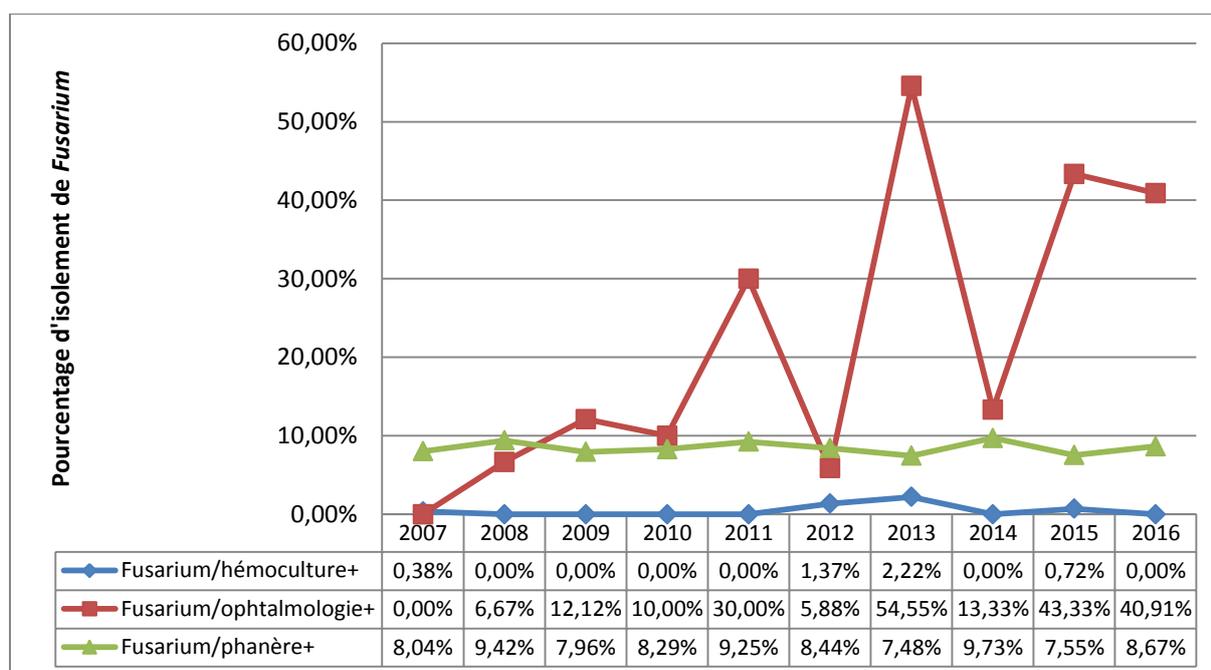


Figure 28 : Evolution de la proportion de *Fusarium* sp au sein des principaux tableaux cliniques (en bleu le nombre de *Fusarium*/nombre d'hémocultures positives, en rouge le nombre de *Fusarium*/nombre prélèvements ophtalmiques positifs, en vert le nombre de *Fusarium*/nombre de prélèvements de phanères positifs, données exprimées en pourcentage)

Concernant les hémocultures positives :

Sur toute la durée de l'étude 2007-2016, en moyenne un *Fusarium* sera isolé dans 0.47 % (ET = 0.77, CV = 136.15 %) des hémocultures positives. De plus le test de Mann-Kendal ne montre pas de tendance identifiable, p-value = 0.760

Concernant les prélèvements ophtalmiques positifs :

Sur toute la durée de l'étude 2007-2016, en moyenne un *Fusarium* sera isolé dans 21.68 % (ET = 18.95, CV = 87.39 %) des prélèvements ophtalmologiques positif. De plus le test de Mann-Kendal montre une tendance à la hausse, p-value = 0.016

Concernant les prélèvements de phanères positifs :

Sur toute la durée de l'étude 2007-2016, en moyenne un *Fusarium* sera isolé dans 8.48 % (ET = 0.78, CV = 9.18 %) des prélèvements de phanères (pied et main) positifs. Aucune année ne s'écarte de plus de 2 ET. De plus le test de Mann-Kendal ne montre pas de tendance identifiable, p-value = 1.000.

2.3.7. Nature des prélèvements positif à *Fusarium*

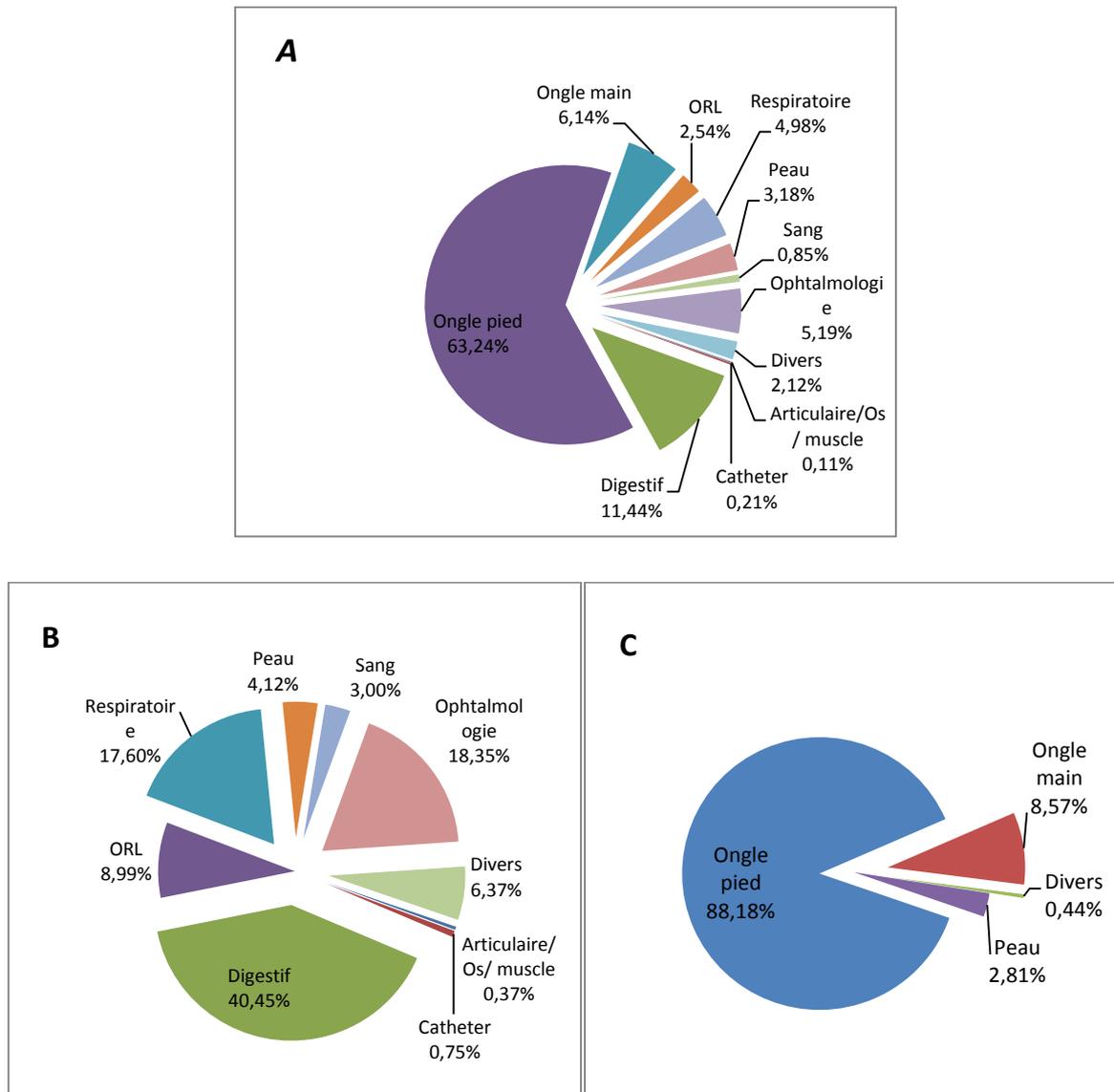


Figure 29 : Nature des prélèvements positifs à *Fusarium*. A : au sein de la structure, B : au sein de l'UF 3151, C : au sein de l'UF 3152.

L'UF 3151 présente une plus grande variété de nature de prélèvement que l'UF 3152. Les prélèvements de l'UF 3152 sont essentiellement des prélèvements unguéaux ; ainsi les ongles de pieds représentent près de 90 % des isollements de *Fusarium*, suivi des ongles de mains pour 8.6 % et enfin des prélèvements cutanés pour 2.8 %. En ce qui concerne l'UF

3151, les prélèvements digestifs arrivent en première position 40 % suivi des prélèvements ophtalmologiques 18.4 % puis des prélèvements respiratoires 17.6 %. A noter que les prélèvements profonds restent marginaux ; les hémocultures ne représentent que 3 % des isollements de *Fusarium* (8 cas en 10 ans) et les prélèvements articulaires, d'os ou de muscles que 0.37 % (1 cas en 2014).

En somme sur les 944 souches de *Fusarium* isolées au laboratoire en 10 ans, une large majorité provenait de prélèvements d'ongles de pieds (63.2 %), suivis en seconde position par les prélèvements digestifs (11.4 %), puis par les ongles de mains (6.1 %) et enfin par les prélèvements ophtalmologiques (5.2 %) (Figure 29).

2.3.8. Nature des espèces de *Fusarium* isolées

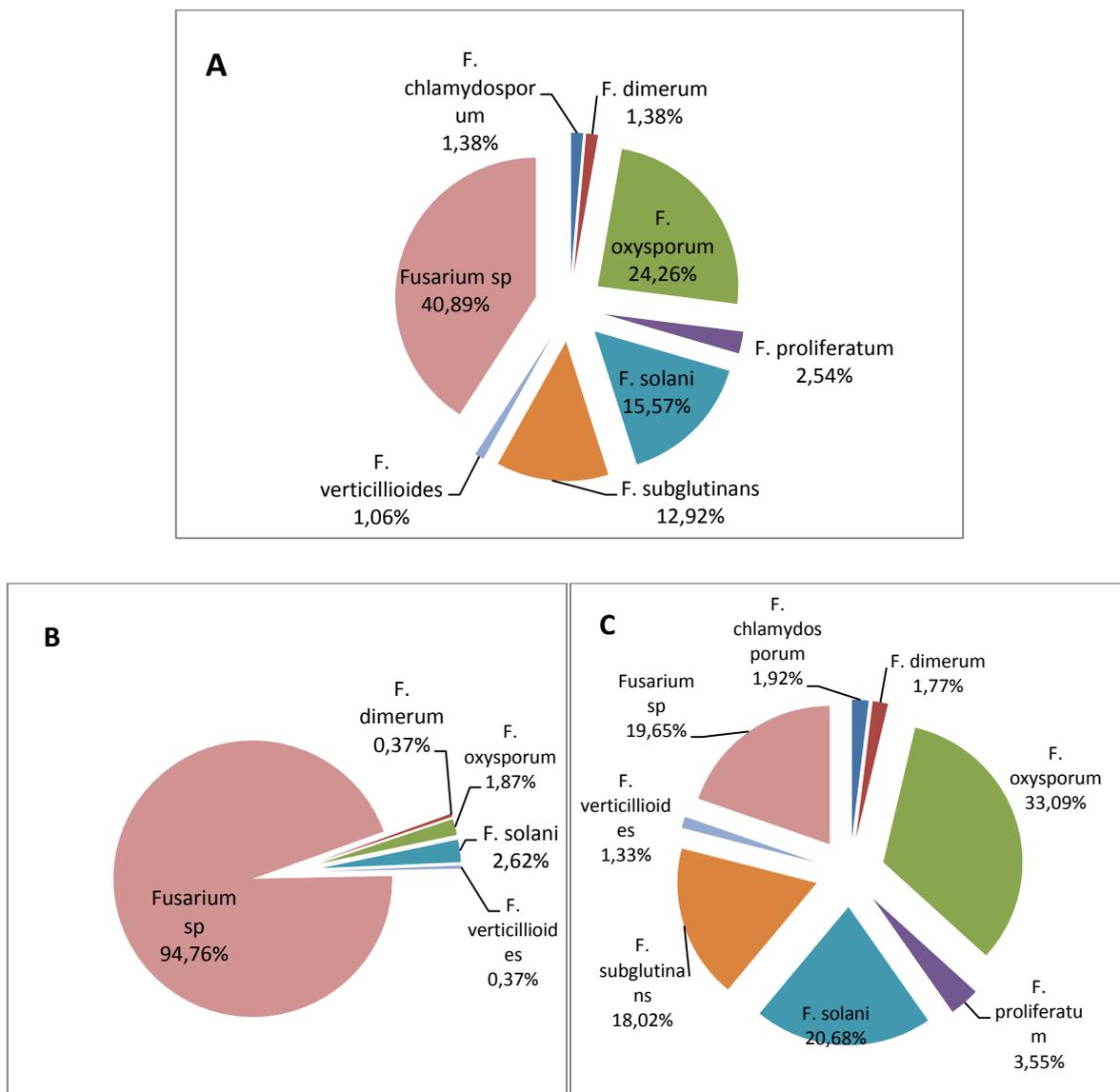


Figure 30 : Espèces de *Fusarium* isolées de 2007 à 2016. A : au sein du laboratoire, B : au sein de l'UF 3151, C : au sein de l'UF 3152

Les *Fusarium* sans espèces identifiées représentent près de 95 % des isollements de l'UF 3151, tandis qu'ils ne représentent que 20 % de l'UF 3152. Sur l'ensemble du laboratoire, *Fusarium sp* représente 41 % des isollements (Figure 30).

La principale espèce de *Fusarium* identifiée est *F oxysporum* pour 24.5 % des isollements, arrive en seconde position *F solani* 15.5 % suivi, sur la dernière marche du podium par *F subglutinans* pour 13 %. Dans de plus faible proportion *F proliferatum* (2.5 %), *F dimerum* (1.5 %), *F chlamydosporum* (1.5 %) et *F verticillioides* (1.1 %) sont également retrouvés.

En considérant uniquement les espèces identifiées, *F oxysporum* représente 41 % des *Fusarium* identifiés, *F solani* 26 %, et *F subglutinans* 22 %. Suivent ensuite *F proliferatum* (4.3 %), *F dimerum* (2.3 %), *F chlamydosporum* (2.3 %) et *F verticillioides* (1.8 %).

2.4. Discussion

2.4.1. Evolution de l'incidence de *Fusarium*

En termes d'évolution absolue, exception faite de 2008, l'isolement de *Fusarium* au sein de la structure est resté stable de 2007 à 2014. Depuis lors, le nombre d'isolat de *Fusarium* au sein de la structure n'a cessé de décroître, de sorte que l'année 2016 se trouve être l'année la moins propice pour l'isolement de *Fusarium*. Ces chiffres pourraient donc laisser croire à une déperdition locale des infections à *Fusarium* depuis 2014.

Néanmoins, il ressort de cette étude que l'unité de dermato-mycologie (UF 3152) représente la majeure partie des isollements de *Fusarium* et c'est cette UF qui est à l'origine de la tendance négative d'isolement de *Fusarium* au laboratoire. Cette tendance à la décroissance n'est cependant pas spécifique de *Fusarium*, elle n'est en réalité que le reflet de la baisse d'activité de l'UF dans son ensemble. Les premières années après la délocalisation de l'UF 3152 du site des hôpitaux urbains vers le site de Brabois n'ont pas eu d'impact fort sur l'activité, mais rapidement une diminution de l'activité s'est fait ressentir. Le départ de cliniciens fortement prescripteurs d'examen mycologiques du service de dermatologie, associé à un moindre rayonnement du laboratoire auprès des dermatologues libéraux, expliquent en partie cette décroissance d'activité.

Ce constat explique donc qu'en termes d'évolution relative (pourcentage d'évolution de *Fusarium*) aucune tendance n'a été statistiquement démontrée sur la décennie étudiée. Néanmoins, il est à noter que l'année 2016 est l'année de la plus faible proportion d'isolement de *Fusarium* de l'étude. Ceci s'expliquant par l'augmentation en 2016 de l'activité de l'UF 3151, en lien avec la fermeture du laboratoire polyvalent de la maternité

régionale et le transfert de son activité sur les laboratoires du CHRU. Mécaniquement l'activité de mycologie de l'UF 3151 a donc progressé en 2016, portée par l'activité de gynéco-obstétrique, activité qui intrinsèquement, ne permet pas l'isolement de *Fusarium*.

Concernant la représentativité de *Fusarium* au sein des prélèvements de phanères, il en ressort qu'en moyenne, ces moisissures sont retrouvées dans 8.48 % des prélèvements positifs, sans évolution notable de cette proportion au cours du temps. Il est difficile de comparer ce chiffre aux publications en la matière, tant la prévalence de *Fusarium* dans les onychomycoses est variable à travers le monde (de 0 % à plus de 50 %). Néanmoins, ce chiffre paraît tout à fait en concordance avec certaines études récentes, notamment l'étude de 2016 qui imputait 10 % des onychomycoses à *Fusarium* [42].

La proportion de *Fusarium* dans les hémocultures positives à champignons est de 0.48 % et ne montre pas de signe d'évolution au cours du temps. Il s'agit donc d'un champignon rarement responsable de fongémie. Cette rareté s'explique principalement par le nécessaire terrain d'immunodépression que doivent présenter les patients pour être atteint de fusarioses invasives.

Enfin la part de *Fusarium* au sein des prélèvements ophtalmiques positifs est en moyenne de 21,6 % sur la décennie. Ce chiffre cache cependant de grandes disparités en fonction des années (de 0 % à 55 %). Malgré ces intenses fluctuations, il est tout de même montré une tendance statistiquement positive pour l'isolement ophtalmique de *Fusarium*. Comme pour les phanères, le niveau d'implication de *Fusarium* dans les kératites fongique varie sensiblement entre les études scientifiques, selon la situation géographique et le terrain étudié. Ainsi une revue de 2015 consacrée aux kératites fongiques, estime que les *Fusarium* sont impliqués dans 70 % des infections avec traumatisme, dans 67 % des kératites du diabétique et dans 38 % des kératites chez les utilisateurs récurrents de topique ophtalmique [56]. Cette forte influence des terrains individuels, associés en plus au risque de contamination des liquides de conservation de lentille, peut expliquer la variabilité inter année du pourcentage d'isolement ophtalmique de *Fusarium*.

2.4.2. Espèces de *Fusarium* en cause

A noter qu'à part de rares exceptions (contextes particuliers), les identifications d'espèces de *Fusarium* ont été effectuées par méthodes phénotypiques.

De par la division historique de la structure en deux UF ; dirigées par des biologistes distincts, des différences de pratiques ont vu le jour. Ainsi, les *Fusarium* de l'UF 3152 étaient plus fréquemment identifiés que ceux de l'UF 3151. L'identification des espèces en cause

dans les infections dermatologiques permet de pointer des particularités au regard de la littérature actuelle. Ainsi, dans la littérature, les *Fusarium* les plus fréquemment retrouvés en pathologie humaine appartiennent au complexe d'espèces FSSC (plus de la moitié des cas) et au complexe FOOSC [40]

Le principal complexe d'espèce retrouvé au CHRU de Nancy est le complexe FOOSC (*F oxysporum*) qui représente 41 % des *Fusarium* identifiés. Le second complexe d'espèce est le GFSC (*F subglutinans* + *F proliferatum* + *F verticillioides*), celui-ci représente 28.1 % des espèces de *Fusarium* identifiées, soit plus que les 26 % du FSSC (*F solani*).

En conséquence le complexe FSSC ne semble figurer qu'à la troisième place au CHRU de Nancy alors qu'il est largement prédominant dans la littérature. En outre, la principale particularité de la cohorte nancéenne réside dans la place prépondérante du complexe GFSC, notamment via l'espèce *F subglutinans*. Il peut s'agir d'une particularité épidémiologique de la région, mais il conviendra de s'assurer de la bonne identification de cette espèce par biologie moléculaire avant de pouvoir l'affirmer.

Pour les 8 hémocultures positives à *Fusarium* durant cette période, les souches isolées ont été conservées congelées. Ces 8 prélèvements correspondaient à 6 patients distincts. Dans un but épidémiologique, nous avons souhaité rétrospectivement identifier ces *Fusarium* par biologie moléculaire. Seules 4 souches distinctes ont pu être identifiées (soit 66 %) : 3 *Fusarium* appartiennent au complexe d'espèces *Fusarium solani* et un au complexe d'espèces *Fusarium oxysporum*.

3. Mise en place d'un schéma d'identification d'espèce

3.1. Introduction

A l'heure actuelle, la pratique courante au sein du laboratoire pour l'identification de *Fusarium* repose essentiellement sur l'identification phénotypique traditionnelle (mise en culture et examen microscopique). En de rares occasions (contexte particulier, prélèvement profond...) une PCR panfongique suivie du séquençage du gène ITS (sur sa partie ITS1-ITS4) peut être effectuée. La séquence obtenue est alors comparée à une base de données internationale « GenBank ». Cette stratégie présente plusieurs écueils potentiels. L'identification d'espèces par les méthodes phénotypiques est difficile et parfois sujette à caution. Concernant l'identification moléculaire par le gène *ITS* et son interprétation dans GenBank, l'expérience du laboratoire montre certaines difficultés d'interprétation : en effet les résultats obtenus ne permettent pas toujours de discriminer avec certitude les espèces de *Fusarium* en cause. De ces insuffisances à *priori*, nous avons voulu évaluer pragmatiquement nos pratiques et réfléchir à de meilleures alternatives.

Tout d'abord nous avons souhaité mettre en place la technique d'identification moléculaire d'espèces de *Fusarium* selon le schéma d'identification proposé par O'Donnel, basé sur l'analyse de 3 gènes : *EF1*, *RPB1* et *RPB2*. Ce schéma d'identification fait référence au sein de la communauté scientifique pour l'identification des *Fusarium*.

Ensuite, nous avons souhaité évaluer nos pratiques actuelles (phénotypiques et ITS) par rapport à ce schéma ainsi que l'intérêt de sa mise en place au laboratoire.

Initialement nous souhaitions ajouter une identification par MultiLocus Sequence Typing (MLST) en combinant les 3 gènes (*EF1*, *RPB1* et *RPB2*) en un seul « *run* ». Ceci est possible grâce à la base de donnée dédiée, créée en collaboration par O'Donnel et hébergé par le Westerdijk Fungal Biodiversity Institute (anciennement nommé CBS-KNAW). Cette base de données présente l'intérêt de n'être incrémentée qu'avec des souches de références d'intérêts médicaux ou environnementaux. De plus la classification y est effectuée selon les dernières recommandations, à savoir en complexe d'espèces. Une telle analyse en MSLT, permet en outre d'identifier les souches de *Fusarium* jusqu'à leurs sous types.

Malheureusement, un « *bug* » informatique au moment de l'exploitation des résultats ne permet pas l'approche MLST : le gène *RPB1* n'étant pas reconnu par la base de données en schéma combiné alors qu'il l'est lorsqu'il est utilisé seul. Nous avons fait remonter ce problème informatique aux gestionnaires de la base de données, mais celui-ci n'est toujours

pas résolu à l'heure de la rédaction de cette thèse. L'exploitation en MLST est donc différée jusqu'à la résolution du problème.

Pour l'heure nous avons choisi de comparer un à un les différents gènes d'identification, afin d'en déduire la meilleure approche possible. Les séquences de tous les gènes ont été comparées à la base de donnée dédiée aux *Fusarium* et les séquences du gène *ITS* ont été comparées à la base « GenBank » pour se rapprocher des pratiques de routine.

3.2. Matériel et méthode

3.2.1. Sélection des souches

Pendant un an (du 1^{er} juin 2016 au 31 mai 2017) toutes les souches de *Fusarium* isolées au laboratoire quelles que soient leurs origines ont été sélectionnées. Ces souches ont été repiquées sur milieu MALT puis congelées à -20°C dans un mélange eau/glycérol (1/1) pour extractions ultérieures.

3.2.2. Extraction ADN

Les souches décongelées ont été mise en culture sur milieu MALT ; après 5 jours de croissance, une extraction a été réalisée grâce au kit « QIAamp DNA Mini Kit® » de Qiagen. L'extraction a été réalisée selon le protocole défini par le fabricant.

3.2.3. Amorces de PCR

Les couples d'amorces utilisés ont servi à la fois pour les PCR d'amplification et pour les PCR de séquençage. Il s'agit des amorces recommandées par O'Donnell [5] (Tableau IX).

Tableau IX : Amorces de PCR pour les gènes étudiés

Gène	Taille (paire de base)	Couples d'amorces
EF1	600	EF1/EF2
RPB1	1700	Fa/R8 et F7/G2R
RPB2	1700	5F2/7CR et 7CF/11AR
ITS	400	ITS1/ITS4

3.2.4. PCR d'amplification

Les PCR ont été réalisées selon les conditions définies dans le tableau X.

Tableau X : Programmes d'amplifications géniques pour les différents gènes

	EF1 et ITS	RPB1 et RPB2
Dénaturation	95°C 2 min	95°C 2 min
Cycle (x40)		
Dénaturation	95°C 30s	95°C 30s
Hybridation	55°C 30s	55°C 1 min
Elongation	72°C 1 min	72°C 2 min
Elongation finale	72°C 5 min	72°C 5 min

La bonne qualité de l'amplification a été vérifiée après toutes les PCR, par migration sur gel d'agarose à 1.8 % et révélation sous UV.

3.2.5. Séquençage

Les PCR de séquençage de type Sanger ainsi que les purifications ont été sous-traitées à la société GenoScreen® de Lille.

3.2.6. Interprétation et bases de données

L'interprétation des chromatogrammes bruts a été effectuée avec le logiciel BioEdit®.

Les séquences ont alors été comparées aux bases de données :

- base non spécifique : GenBank du NCBI

https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch

- base spécifique : base de référence spécifique *Fusarium*

<http://www.westerdijkinstituut.nl/Fusarium>

3.2.7. Expression des résultats

Pour un isolat de *Fusarium* et un gène donné, les résultats de la comparaison de la séquence à une base de données sont exprimés dans le Tableau XI comme suit :

- Seules les vingt premières occurrences sont prises en compte.
- Les pourcentages maximum, médians et minimum de similarité de séquence sont rapportés.
- Les correspondances du 1^{er} ordre (correspondance avec le pourcentage maximum de

similarité de séquence) sont quantifiées et qualifiées en terme de complexe d'espèces et de sous type de *Fusarium* si possible.

- Les vingt occurrences sont qualifiées en termes de complexe d'espèces.

L'expression des résultats entre les deux bases de données n'étant pas exactement superposable, un aménagement spécifique a été réalisé pour l'expression des résultats GenBank : les résultats ne sont pas forcément exprimés en complexe d'espèces et les pourcentages de similarité sont exprimés au pourcent près (*versus* un dixième de pourcent pour la base spécifique).

De plus, pour chaque souche, figure dans le Tableau XI l'identification phénotypique effectuée par le laboratoire et entre parenthèse le complexe d'espèce correspondant. Y figure également l'identification moléculaire retenue compte tenu de l'ensemble des informations.

L'ensemble des données brutes relatives à l'identification moléculaire des souches de *Fusarium* figurant dans le Tableau XI, sera synthétisé dans le Tableau XII comme suit : pour chaque gène, les pourcentages maximum, médians et minimum de similarité seront moyennés par complexe d'espèce. De plus pour chaque gène, le nombre de propositions d'identifications différentes du 1^{er} ordre et des 20 occurrences seront également moyennés par complexe d'espèces.

3.3. Résultats

3.3.1. Sélection des souches

Sur la période, 41 *Fusarium* ont été identifiés au laboratoire dont 33 ont pu être extraits, soit 80 %. Les 8 souches non extraites n'ont soit pas pu être isolées pures, soit n'ont pas poussé en culture après décongélation.

3.3.2. Identification phénotypique

8 *Fusarium* n'ont pas été identifiés phénotypiquement jusqu'à l'espèce soit 24 %.

25 *Fusarium* ont bénéficié d'une identification phénotypique soit 76 %.

La répartition des espèces identifiées est présentée dans la Figure 31.

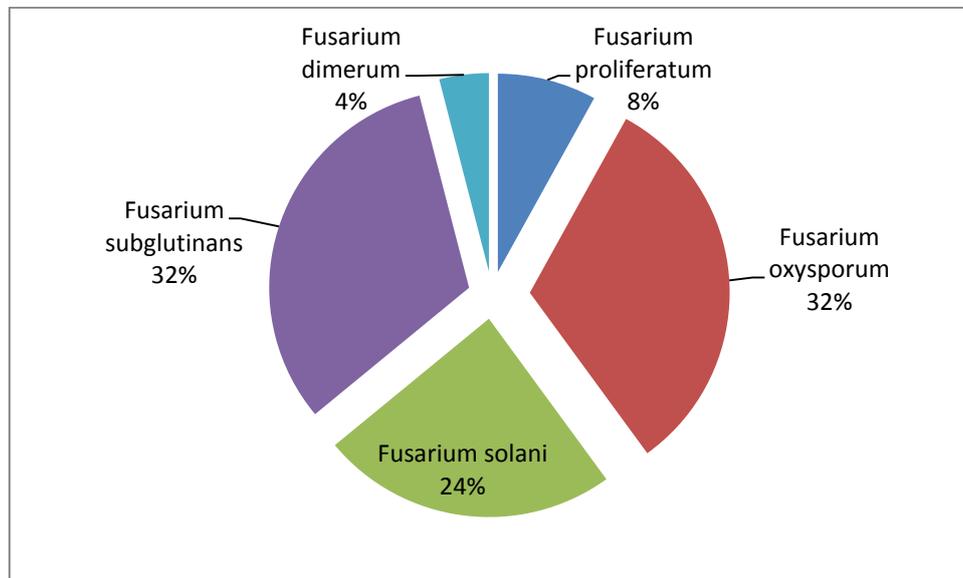


Figure 31 : Répartition des espèces de *Fusarium* isolés pendant l'étude prospective et identifiées par phénotypie.

3.3.3. Séquençage

Quatre chromatogrammes n'ont pas été suffisamment de bonne qualité pour être interprétés. Il s'agissait systématiquement de la seconde moitié du gène RPB1 (couple d'amorce F7/G2R). Néanmoins, les comparaisons à la base de données ont pu être effectuées sur la première moitié du gène (couple d'amorce Fa/R8) ; cette spécificité est précisée dans le Tableau XI.

3.3.4. Identification des *Fusarium*

Tableau XI : Comparaison des différentes stratégies d'identification des *Fusarium* (FU1 à FU33) : ITS (GenBank), ITS, EF1, RPB1, RPB2 (base de données spécifiques) et phénotypique. A l'extrême droite, l'identification consensus retenue.

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU1	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium sp. Fusarium keratoplasticum	Fusarium solani species complex type : 2-h (x2)	Fusarium solani species complex type : 2-d (x5), 2-h (x2)	Fusarium solani species complex	Fusarium solani species complex type : 2-d (x5), 2-f	Fusarium solani (Fusarium solani species complex)	Fusarium solani species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	2	2	7	1	6		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	97,70	100,00		
	% médian de similarité	99	99,81	99,84	85,80	98,27		
	% minimal de similarité	99	99,79	98,91	84,33	96,90		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium keratoplasticum (x3) Fusarium sp. (x11) Fusarium solani (x5) Nectria haematococca isolate (x1)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x8) Fusarium septosum species complex Fusarium buxicola species complex (x2) Fusarium staphyleae species complex Fusarium lateritium species complex (x2) Fusarium decemcellulare species complex (x2) Fusarium albidum species complex Fusarium buharicum species complex Fusarium rusci species complex Fusarium torreyae species complex	Fusarium solani species complex (x20)		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU2	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium solani (x3) Nectria haematococca Fusarium keratoplasticum	Fusarium solani species complex MLST type : 2-x, (x2), 3+4-kkk (x2), 2-d (x6), 2-f (x5), 2-j (x2), 2-b, 2-w (x2)	Fusarium solani species complex type : 2-a	Fusarium solani species complex	Fusarium solani species complex type: 2-d (x5), 2-f	Fusarium solani (Fusarium solani species complex)	Fusarium solani species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	5	20	1	1	6		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	97,63	99,87		
	% médian de similarité	99	100,00	99,69	85,65	98,16		
	% minimal de similarité	99	100,00	99,23	84,26	96,69		
Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium solani (x5) Nectria haematococca (x1) Fusarium keratoplasticum (x3) Fusarium sp. (x11)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x8) Fusarium septosum species complex Fusarium buxicola species complex (x2) Fusarium staphyleae species complex Fusarium lateritium species complex (x2) Fusarium decemcellulare species complex (x2) Fusarium albidum species complex Fusarium buharicum species complex Fusarium rusci species complex Fusarium torreyae species complex	Fusarium solani species complex (x20)			
FU3	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium sp, Tricholoma matsutake (x2) Fusarium solani (x3)	Fusarium solani species complex type : 11-c	Fusarium solani species complex type : 11-c	Fusarium solani species complex	Fusarium solani species complex	Fusarium subglutinans (Gibberella fujikuroi species complex)	Fusarium solani species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	6	2	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,93	99,81		
	% médian de similarité	99	98,88	98,07	85,81	96,95		
	% minimal de similarité	99	98,53	97,92	84,07	96,95		
Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium sp (x4) Tricholoma matsutake (x2) Fusarium solani (x9) Fungal sp. (x2) Nectria sp. (x3)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x8) Fusarium septosum species complex Fusarium buxicola species complex (x2) Fusarium staphyleae species complex Fusarium lateritium species complex (x2) Fusarium decemcellulare species complex (x2) Fusarium albidum species complex Fusarium buharicum species complex Fusarium rusci species complex Fusarium chlamyosporum species complex	Fusarium solani species complex (x20)			

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU4	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium solani (x12) Fusarium keratoplasticum (x8)	Fusarium solani species complex MLST type : 2-x, (x2), 3+4-kkk (x2), 2-d (x7), 2- f (x3), 2-j, 2-b, 2-g, 2-v (x2), 2- a	Fusarium solani species complex type : 2-k	Fusarium solani species complex	Fusarium solani species complex type : 2-d (x4), 2-f	Fusarium subglutinans (Gibberella fujikuroi species complex)	Fusarium solani species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre		20	1	1	6		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	97,77	99,94		
	% médian de similarité	100	100,00	98,61	85,76	98,23		
	% minimal de similarité	100	100,00	98,46	84,23	96,88		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium solani (x12) Fusarium keratoplasticum (x8)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x8) Fusarium septosum species complex Fusarium buxicola species complex (x2) Fusarium staphyleae species complex Fusarium lateritium species complex (x2) Fusarium decemcellulare species complex (x2) Fusarium albidum species complex Fusarium buharicum species complex Fusarium rusci species complex Fusarium torreyae species complex	Fusarium solani species complex (x20)		

FU5	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 132	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium subglutinans (Gibberella fujikuroi species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1er ordre	100	100,00	100,00	99,48	99,76		
	% médian de similarité	100	98,62	99,17	96,36	95,84		
	% minimal de similarité	100	94,74	99,17	94,95	95,20		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x16) Gibberella fujikuroi species complex Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU6	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum (x12) Fusarium sp (x8)	Fusarium oxysporum species complex type : 1, 126, 202, 53 (x2), 109 (x2) Gibberella fujikuroi species complex	Fusarium oxysporum species complex type : 191, 210, 4, 196, 159, 101, 170	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum (Fusarium oxysporum species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	8	7	1	2		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,93	99,82		
	% médian de similarité	100	99,78	99,84	96,66	95,83		
	% minimal de similarité	100	93,24	99,84	95,12	95,07		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x12) Fusarium sp. (x8)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x18) Gibberella fujikuroi species complex (x2)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesense species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesense species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

FU7	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Nectria haematococca (x2) Fusarium solani (x10) Fusarium sp. (x6) Fungal sp. Trametes corrugata	Fusarium solani species complex type : 18-a, 18-b (x2)	Fusarium solani species complex type : 1-b (x5), 18-b, 1-a (x2), 1-e	Fusarium solani species complex	Fusarium solani species complex type : 18-b, 18-a	Fusarium solani (Fusarium solani species complex)	Fusarium solani species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	3	9	1	2		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	98,63	94,98	99,04		
	% médian de similarité	100	99,32	98,62	83,90	98,97		
	% minimal de similarité	100	99,32	97,87	82,24	96,42		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Nectria haematococca (x2) Fusarium solani (x10) Fusarium sp. (x6) Fungal sp. Trametes corrugata	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x8) Fusarium septosum species complex Fusarium buxicola species complex (x2) Fusarium staphyleae species complex Fusarium lateritium species complex (x2) Fusarium decemcellulare species complex (x2) Fusarium sambucinum species complex Fusarium buharicum species complex Fusarium rusci species complex Fusarium chlamyosporum species complex	Fusarium solani species complex (x20)		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU8	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 53, 142, 48, 113, 256, 55, 16	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium subglutinans (Gibberella fujikuroi species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	7	2	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,67	99,76		
	% médian de similarité	100	98,62	99,84	99,65	92,45		
	% minimal de similarité	100	94,72	99,68	95,21	95,30		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

FU9	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium dimerum	Fusarium dimerum species complex	Fusarium dimerum species complex	Fusarium dimerum species complex	Fusarium dimerum species complex	Fusarium dimerum (Fusarium dimerum species complex)	Fusarium dimerum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	20	20	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	99	99,62	99,83	99,73	100,00		
	% médian de similarité	99	99,62	99,83	80,55	82,43		
	% minimal de similarité	99	99,62	99,83	79,93	82,13		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium dimerum (x18) Fusarium sp. (x2)	Fusarium dimerum species complex (x20)	Fusarium dimerum species complex (x20)	Fusarium dimerum species complex (x6) Fusarium solani species complex (x8) Fusarium decemcellulare species complex (x2) Fusarium albidum species complex Fusarium buxicola species complex Fusarium sambucium species complex Fusarium incarnatum-equiseti species complex	Fusarium dimerum species complex (x6) Fusarium solani species complex (x14)		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU10	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum (x2) Fusarium proliferatum (x6) Fusarium fujikuroi (x2) Uncultured endophytic fungus genomic (x3) Fusarium sp. (x7)	Gibberella fujikuroi species complex	Gibberella fujikuroi species complex	Gibberella fujikuroi species complex	Gibberella fujikuroi species complex	Fusarium subglutinans (Gibberella fujikuroi species complex)	Gibberella fujikuroi species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	99,50	99,60	99,70		
	% médian de similarité	100	98,59	91,86	94,86	96,43		
	% minimal de similarité	100	91,72	91,86	93,93	95,55		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x2) Fusarium proliferatum (x6) Fusarium fujikuroi (x2) Uncultured endophytic fungus genomic (x3) Fusarium sp. (x7)	Gibberella fujikuroi species complex (x10) Fusarium chlamydosporum species complex (x10)	Gibberella fujikuroi species complex (x5) Fusarium oxysporum species complex (x15)	Gibberella fujikuroi species complex (x10) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium oxysporum species complex (x3) Fusarium newnesnese species complex Fusarium sp.	Gibberella fujikuroi species complex (x10) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium oxysporum species complex (x3) Fusarium newnesnese species complex Fusarium sp.		
FU11	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum (x2) Fusarium proliferatum (x6) Fusarium fujikuroi (x2) Uncultured endophytic fungus genomic (x3) Fusarium sp. (x7)	Gibberella fujikuroi species complex	Gibberella fujikuroi species complex	Gibberella fujikuroi species complex <u>(Uniquement sur Fa/R8)</u>	Gibberella fujikuroi species complex	Fusarium sp	Gibberella fujikuroi species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	99,84	100,00	99,70		
	% médian de similarité	100	98,60	91,08	96,92	96,43		
	% minimal de similarité	100	91,90	91,07	95,65	95,55		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x2) Fusarium proliferatum (x6) Fusarium fujikuroi (x2) Uncultured endophytic fungus genomic (x3) Fusarium sp. (x7)	Gibberella fujikuroi species complex (x10) Fusarium chlamydosporum species complex (x10)	Gibberella fujikuroi species complex (x6) Fusarium oxysporum species complex (x14)	Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium newnesnese species complex Fusarium sp.	Gibberella fujikuroi species complex (x10) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium oxysporum species complex (x3) Fusarium newnesnese species complex Fusarium sp.		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU12	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 132	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,47	99,76		
	% médian de similarité	100	98,63	99,20	96,45	95,78		
	% minimal de similarité	100	94,76	99,03	95,00	95,20		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

FU13	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 132	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium subglutinans (Gibberella fujikuroi species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,16	99,76		
	% médian de similarité	100	99,76	99,19	96,08	95,78		
	% minimal de similarité	100	93,02	99,03	94,73	95,20		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU14	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium solani (x12) Fusarium keratoplasticum (x8)	Fusarium solani species complex type : 2-x (x2), 3+4-kkk (x2), 2-d (x6), 2-f (x5), 2-j (x2), 2-b, 2-w (x2)	Fusarium solani species complex type : 2-h(x2), 2-d (x5)	Fusarium solani species complex <u>(Uniquement sur Fa/R8)</u>	Fusarium solani species complex type : 2-d (x5), 2-f	Fusarium sp.	Fusarium solani species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	20	7	1	6		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	98,09	100,00		
	% médian de similarité	100	100,00	99,84	87,11	98,26		
	% minimal de similarité	100	100,00	98,85	85,71	96,89		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium solani (x12) Fusarium keratoplasticum (x8)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x8) Fusarium decemcellulare species complex (x2) Fusarium septosum species complex Fusarium buxicola species complex (x2) Fusarium staphyleae species complex Fusarium lateritium species complex (x2) Fusarium sambucinum species complex (x2) Fusarium albidum species complex Fusarium rusci species complex	Fusarium solani species complex (x20)		
FU15	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 132	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,47	99,76		
	% médian de similarité	100	99,76	99,19	96,65	95,78		
	% minimal de similarité	100	93,02	99,03	95,00	95,20		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesense species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesense species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU16	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 132	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,47	99,76		
	% médian de similarité	100	99,76	99,17	96,45	95,73		
	% minimal de similarité	100	93,01	99,00	95,00	95,20		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		
FU17	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium solani (x12) Fusarium sp. (x7) Uncultured fungus clone	Fusarium solani species complex type : 5-p (x2), 5-a, 5-c (x7), 5-o (x4), 2-f (x2), 5-n (x4)	Fusarium solani species complex type: 5-j	Fusarium solani species complex <u>(Uniquement sur Fa/R8)</u>	Fusarium solani species complex type: 5-c, 5-h	Fusarium sp.	Fusarium solani species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	20	1	1	2		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	98,31	100,00		
	% médian de similarité	100	100,00	99,23	87,28	98,26		
	% minimal de similarité	100	100,00	97,39	85,47	97,30		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium solani (x12) Fusarium sp. (x7) Uncultured fungus clone	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species species complex (x8) Fusarium decemcellulare species complex (x2) Fusarium septosum species complex Fusarium buxicola species complex (x2) Fusarium staphyleae species complex Fusarium lateritium species complex (x2) Fusarium sambucinum species complex (x2) Fusarium babinda species complex Fusarium rusci species complex	Fusarium solani species complex (x20)		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU18	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 132	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium proliferatum (Gibberella fujikuroi species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,48	99,65		
	% médian de similarité	100	99,76	99,14	96,02	95,68		
	% minimal de similarité	100	92,97	98,96	94,92	95,15		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

FU19	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum (x19) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 132	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum (Fusarium oxysporum species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	99,84	99,40	99,76		
	% médian de similarité	100	99,77	99,03	96,44	95,73		
	% minimal de similarité	100	92,41	98,87	94,93	95,20		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x19) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU20	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium sp. (x5) Fusarium solani (x15)	Fusarium solani species complex type : 6-j, 6-b (x2), 6-c (x2) , 6-h (x2), 6-i (x2), 6-e (x2), 6-f (x2), 6-a(x2), 6-j(x4), 6-g	Fusarium solani species complex type : 6-i	Fusarium solani species complex	Fusarium solani species complex type: 6-j	Fusarium solani (Fusarium solani species complex)	Fusarium solani species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	20	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	99,66	97,63	100,00		
	% médian de similarité	100	100,00	94,91	85,71	97,37		
	% minimal de similarité	100	100,00	94,41	84,44	97,18		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium sp. (x5) Fusarium solani (x15)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species species complex (x8) Fusarium decemcellulare species complex (x2) Fusarium septosum species complex Fusarium staphyleae species complex Fusarium chlamydosporum species complex Fusarium buharicum species complex (x2) Fusarium sambucinum species complex Fusarium albidum species complex Fusarium lateritium species complex Fusarium buxicola species complex (x2)		
FU21	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 1, 126, 202, 109 (x2), 53 (x2) Gibberella fujikuroi species complex	Fusarium oxysporum species complex type : 132, 223, 220, 144	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum (Fusarium oxysporum species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	8	4	2	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,61	99,76		
	% médian de similarité	100	99,77	99,65	96,44	95,78		
	% minimal de similarité	100	92,41	99,49	94,93	95,20		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x4)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU22	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type:237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 10	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum (Fusarium oxysporum species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	2	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,40	99,82		
	% médian de similarité	100	99,76	99,83	96,57	95,79		
	% minimal de similarité	100	92,71	99,66	94,79	95,20		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

FU23	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 1, 126, 202, 109 (x2), 53 (x2) Gibberella fujikuroi species complex	Fusarium oxysporum species complex type : 233	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum (Fusarium oxysporum species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	8	1	2	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,67	99,88		
	% médian de similarité	100	99,77	99,50	96,53	95,89		
	% minimal de similarité	100	92,53	99,50	94,98	95,30		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x4)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU24	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 233	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium subglutinans (Gibberella fujikuroi species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	2	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	99,83	99,54	99,59		
	% médian de similarité	100	99,76	99,35	96,52	95,55		
	% minimal de similarité	100	92,77	99,35	94,94	95,09		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

FU25	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 1, 126, 202, 109 (x2), 53 (x2) Gibberella fujikuroi species complex	Fusarium oxysporum species complex type : 145	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum (Fusarium oxysporum species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	8	1	1	2		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	99,83	99,93	99,53		
	% médian de similarité	100	99,77	98,70	96,78	95,61		
	% minimal de similarité	100	92,25	98,70	95,20	95,03		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x4)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU26	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum (x14) Fusarium sp. (x6)	Fusarium oxysporum species complex type : 1, 126, 202, 109 (x2), 53 (x2) Gibberella fujikuroi species complex	Fusarium oxysporum species complex type : 206, 160	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	8	2	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	99,76	100,00	99,87	100,00		
	% médian de similarité	100	99,77	99,66	96,54	95,61		
	% minimal de similarité	100	92,25	99,50	95,00	94,97		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x14) Fusarium sp. (x6)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x4)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		
FU27	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum (x5) Fusarium sp. Fusarium lateritium	Fusarium oxysporum species complex type : 183 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 183, 62	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum (Fusarium oxysporum species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	7	2	2	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,41	99,76		
	% médian de similarité	100	99,52	99,34	96,39	95,73		
	% minimal de similarité	100	92,58	99,34	94,94	95,20		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x18) Fusarium sp. Fusarium lateritium	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU28	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium lactis (x3) Uncultured Basidiomycota Fusarium sp.	Gibberella fujikuroi species complex	Gibberella fujikuroi species complex	Gibberella fujikuroi species complex	Fusarium nisikadoi species complex	Fusarium proliferatum (Gibberella fujikuroi species complex)	Gibberella fujikuroi species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	5	8	1	2	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	99,30	99,48	98,46	96,84		
	% médian de similarité	99	98,84	96,87	95,82	95,73		
	% minimal de similarité	99	97,68	95,48	94,80	94,85		
Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium lactis (x3) Uncultured Basidiomycota Fusarium sp. (x10) Fusarium oxysporum Fusarium subglutinans Fusarium verticillioides Fusarium temperatum Fusarium proliferatum Uncultured fungus isolate	Gibberella fujikuroi species complex (x12) Fusarium oxysporum species complex (x8)	Gibberella fujikuroi species complex (x20)	Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium sp. Fusarium newnesense species complex	Fusarium nisikadoi species complex (x5) Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium sp. Fusarium newnesense species complex			

FU29	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium keratoplasticum (x3) Fusarium solani (x5) Fusarium sp.	Fusarium solani species complex type : 2-x (x2), 2-b, 2-d (x2), 2-f (x3), 2-j, 3+4-kkk (x2),	Fusarium solani species complex type : 2-k	Fusarium solani species complex	Fusarium solani species complex type : 2-d (x5), 2-f	Fusarium solani (Fusarium solani species complex)	Fusarium solani species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	9	11	1	1	6		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	99,78	100,00	97,75	99,94		
	% médian de similarité	99	99,78	98,59	85,75	98,24		
	% minimal de similarité	99	99,77	98,44	84,32	96,95		
Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium keratoplasticum (x3) Fusarium solani (x16) Fusarium sp.	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x8) Fusarium decemcellulare species complex (x2) Fusarium septosum species complex Fusarium staphyleae species complex Fusarium chlamyosporum species complex Fusarium buharicum species complex Fusarium sambucinum species complex Fusarium albidum species complex Fusarium lateritium species complex Fusarium buxicola species complex (x2) Fusarium torreyae species complex	Fusarium solani species complex			

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU30	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium petroliophilum (x11) Fusarium solani (x5) Fusarium sp. (x4)	Fusarium solani species complex type : 1-c, 1-b (x4), 1-e (x2),	Fusarium solani species complex type : 1-b (x5), 1-a (x3)	Fusarium solani species complex	Fusarium solani species complex type : 1-a (x2), 1-b (x6)	Fusarium solani (Fusarium solani species complex)	Fusarium solani species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	7	8	1	8		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	96,51	100,00		
	% médian de similarité	100	99,78	99,68	85,75	99,71		
	% minimal de similarité	100	95,95	97,67	85,04	97,18		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium petroliophilum (x11) Fusarium solani (x5) Fusarium sp. (x4)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species complex (x20)	Fusarium solani species species complex (x4) Fusarium decemcellulare species complex (x2) Fusarium buxicola species complex Fusarium sambucinum species complex (x2) Fusarium rusci Fusarium babinda (X2) Fusarium chlamydosporum (x3) Fusarium triticum Fusarium sambucinum (x3) Fusarium incarnatum-equiseti	Fusarium solani species complex (x20)		

FU31	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 246, 155, 148, 146, 104, 12	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum (Fusarium oxysporum species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	6	2	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,67	99,70		
	% médian de similarité	100	99,76	99,02	96,39	95,78		
	% minimal de similarité	100	92,77	98,85	94,94	95,14		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

		ITS GENE BANK	ITS	EF1	RPB1	RPB2	Identification phénotypique	Identification retenue
FU32	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 132	Fusarium oxysporum species complex <u>(Uniquement sur Fa/R8)</u>	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium subglutinans (Gibberella fujikuroi species complex)	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	2	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,62	99,76		
	% médian de similarité	100	99,76	99,19	97,21	95,73		
	% minimal de similarité	100	92,92	99,02	96,32	95,20		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

FU33	Réponse de 1er ordre (complexe + sous type)	Fusarium oxysporum	Fusarium oxysporum species complex type : 237 (x2), 48 (x2)	Fusarium oxysporum species complex type : 132	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium oxysporum species complex	Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex
	Nombres de réponse du 1 ^{er} ordre	20	4	1	1	1		
	% de similarité des réponses de 1 ^{er} ordre	100	100,00	100,00	99,48	99,20		
	% médian de similarité	100	99,76	99,18	96,38	95,17		
	% minimal de similarité	100	92,77	99,02	94,89	94,67		
	Répartitions des vingt premières occurrences	Fusarium oxysporum (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x15) Gibberella fujikuroi species complex (x2) Fusarium incarnatum-equiseti species complex (x3)	Fusarium oxysporum species complex (x20)	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Gibberella fujikuroi species complex (x9) Fusarium sp.	Fusarium oxysporum species complex (x4) Fusarium nisikadoi species complex (x5) Fusarium newnesnese species complex Fusarium redolens species complex (x2) Gibberella fujikuroi species complex (x7) Fusarium sp.		

3.3.5. Répartition des complexes d'espèces identifiés par biologie moléculaire

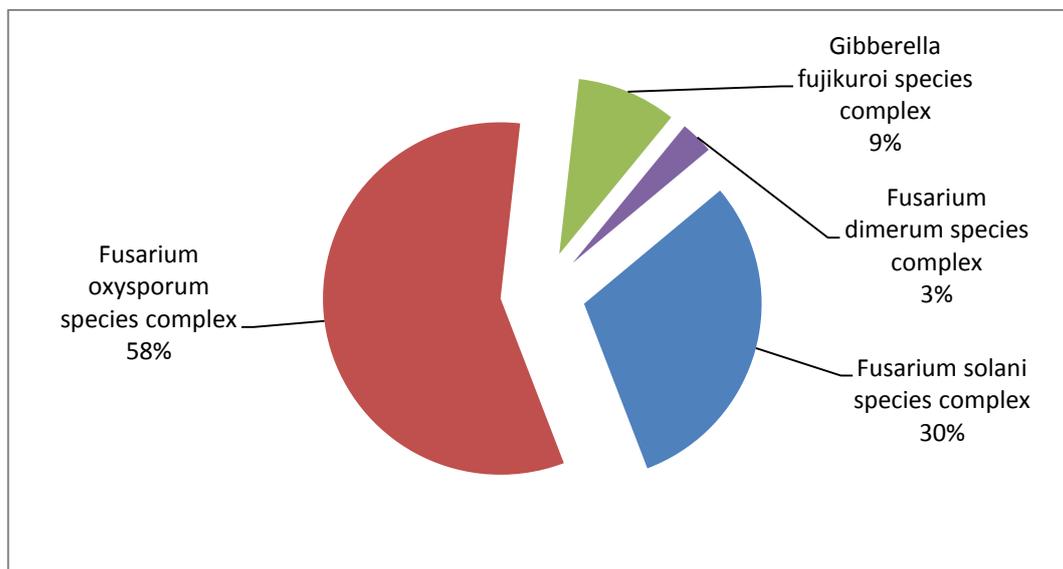


Figure 32 : Répartition des complexes d'espèces de *Fusarium* identifiés par biologie moléculaire

Sur l'ensemble des 33 *Fusarium* de la période, *Fusarium oxysporum* species complex représente 19 isolats, soit 58 %, *Fusarium solani* species complex 10 isolats, soit 30 %, *Gibberella fujikuroi* species complex 3 isolats soit 9 % et *Fusarium dimerum* species complex 1 isolat, soit 3 %.

3.3.6. Intérêt des différents gènes pour l'identification

Tableau XII : Pourcentage de similarité (max, médian, min) moyen et nombre de réponses différentes (du 1^{er} ordre et total) moyenne par type de complexe d'espèces et par gène

		<i>Fusarium oxysporum</i> species complex (n=19)	<i>Fusarium solani</i> species complex (n=10)	<i>Gibberella fujikuroi</i> species complex (n=3)	<i>Fusarium dimerum</i> species complex (n=1)
ITS GENBANK	% similarité maximal	100	100	100	99
	% similarité médian	100	99,6	99,67	99
	% similarité minmal	100	99,6	99,67	99
	Nombre de réponses différentes du 1 ^{er} ordre	1,21	2,80	4,33	1,00
	Nombre de réponses différentes des 20 occurrences	1,21	3,30	6,33	2,00
ITS	% similarité maximal	99,99	99,98	99,77	99,62
	% similarité médian	99,57	99,73	98,68	99,62
	% similarité minmal	93,04	99,26	91,81	99,62
	Nombre de réponses différentes du 1 ^{er} ordre	1,21	1,00	1,00	1,00
	Nombre de réponses différentes des 20 occurrences	3,00	1,00	2,00	1,00
EF1	% similarité maximal	99,97	99,83	99,61	99,83
	% similarité médian	99,33	98,71	93,27	99,83
	% similarité minmal	99,21	97,91	92,80	99,83
	Nombre de réponses différentes du 1 ^{er} ordre	1,00	1,00	1,00	1,00
	Nombre de réponses différentes des 20 occurrences	1,05	1,00	1,67	1,00
RPB1	% similarité maximal	99,56	97,63	99,35	99,73
	% similarité médian	96,66	85,85	95,87	80,55
	% similarité minmal	95,04	84,41	94,79	79,93
	Nombre de réponses différentes du 1 ^{er} ordre	1,00	1,00	1,00	1,00
	Nombre de réponses différentes des 20 occurrences	5,00	9,90	5,00	7,00
RPB2	% similarité maximal	99,73	99,86	98,75	100,00
	% similarité médian	95,54	98,24	96,20	82,43
	% similarité minmal	95,14	96,93	95,32	82,13
	Nombre de réponses différentes du 1 ^{er} ordre	1,00	1,00	1,00	1,00
	Nombre de réponses différentes des 20 occurrences	6,00	1,00	4,67	2,00

D'après les données compilées dans le Tableau XII il est possible de constater que :

- Les performances d'identification des gènes ITS, RPB1 et RPB2 dépendent du complexe d'espèce à identifier.
- EF1 est le gène le plus polyvalent, ses performances sont les moins affectées par le changement de complexe d'espèce.

- Les nombres de réponses différentes du 1^{er} ordre du gène ITS avec la base GenBank sont élevés pour les complexes d'espèces *Fusarium solani* et *Gibberella fujikuroi*.
- Les nombres de réponses différentes du 1^{er} ordre de tous les gènes avec la base spécifique sont égaux ou proche de 1.
- Les nombres de réponses différentes parmi les 20 occurrences sont faibles avec EF1 quel que soit le complexe, avec ITS GenBank pour le complexe *Fusarium oxysporum*, avec ITS en base de données spécifique pour tous les complexes sauf *Fusarium oxysporum*.
- Les nombres de réponses différentes parmi les 20 occurrences sont élevés pour tous les complexes avec RPB1 et RPB2 à l'exception du complexe *Fusarium solani* avec RPB2

3.3.7. Discordance entre l'identification par biologie moléculaire et phénotypique

Huit identifications discordantes sont observées, soit 32 % : 7 concernent *Fusarium subglutinans* (*Fusarium oxysporum* species complex ou *Fusarium solani* species complex en biologie moléculaire) et 1 concerne *Fusarium proliferatum* (*Fusarium oxysporum* species complex en biologie moléculaire).

3.4. Discussion

3.4.1. Discordance entre l'identification par biologie moléculaire et phénotypique

Les insuffisances *à priori* de nos pratiques de laboratoire sont confirmées dans cette étude. En ce qui concerne l'identification phénotypique, même si les résultats sont globalement bons, nous montrons une discordance notable quant à l'identification de l'espèce *F. subglutinans* qui n'est pas retrouvée en identification moléculaire. Ces souches sont identifiées sans ambiguïté soit en *Fusarium oxysporum* species complex soit en *Fusarium solani* species complex par l'identification génique. Il est intéressant de noter que ces identifications erronées de *F. subglutinans* ne correspondent pas à un seul et unique complexe d'espèce.

Au vu de ces résultats, nous infirmons ici la particularité nancéenne mise en évidence dans la partie 2 de cette thèse.

3.4.2. Identification par biologie moléculaire

D'un point de vue moléculaire, une identification idéale par comparaison de séquence à une base de données, se présenterait dans notre étude par 20 occurrences identiques avec des taux de similarité très élevés (>> 98 %). Ainsi, l'identification idéale se présenterait dans le Tableau XII, par des pourcentages de similarité élevés et des nombres de réponses différentes à 1 (pour le 1^{er} ordre et les 20 occurrences). Malheureusement cette situation n'est pas systématique d'où la nécessité de rechercher un schéma d'identification optimal.

3.4.2.1. Evaluation des pratiques de routine

Concernant l'identification par ITS avec la base de données universelle GenBank, nous rencontrons ici quelques difficultés d'identifications (ex : FU 1, 2, 10, 11, 28...). Ces difficultés sont multifactorielles.

Premièrement, nous avons pu observer presque systématiquement que les 20 premières occurrences avaient un taux de similarité de séquence de 100 %, ceci étant appréciable lorsque les 20 propositions sont identiques, mais devient très problématique (aucune discrimination possible) lorsque les propositions sont différentes et correspondent à des champignons différents. Ce point est illustré dans le Tableau XII, par des moyennes de nombre de propositions élevées en ce qui concerne les complexes *Fusarium solani* et *Gibberella fujikuroi*.

La deuxième difficulté tient à la présence de résultats incomplets ne permettant aucune identification : uniquement le genre (*Fusarium sp.*) voire uniquement le règne (*Fungal sp.*, Uncultured endophytic fungus genomic...).

Enfin l'expression hétérogène des résultats d'identifications (le plus souvent en genre et espèce, rarement en complexe d'espèce et parfois en forme sexuée) n'aide en rien l'utilisateur.

Néanmoins il est à noter l'identification sans ambiguïté des souches de *Fusarium oxysporum* par cette base de données.

3.4.2.2. Evaluation de la base de données spécifique

Concernant l'utilisation de la base de données spécifique de *Fusarium*, certains des avantages pressentis avant ce travail se confirment, notamment l'expression homogène des résultats sous forme de complexe d'espèces.

Par ailleurs, il est à noter la bonne cohérence globale entre les différents résultats pour tous les gènes étudiés (ITS, EF1, RPB1 et RPB2), aucune divergence d'identification de complexe n'a été relevée. Néanmoins, l'utilisation un à un des gènes sans recourir à la MLST, ne permet pas d'identifier un *Fusarium* jusqu'à son sous type.

En ce qui concerne les gènes RPB 1 et 2, le principal problème (exception faite du complexe *Fusarium solani* pour RPB2) tient au nombre restreint d'occurrence spécifique trouvé. En effet il est fréquent d'avoir moins d'une dizaine d'occurrences avec de fort pourcentage de similarité (> 98 %) et d'avoir ensuite une grande diversité de complexe d'espèces mais avec des pourcentages plus faible. Ceci peut s'expliquer par un faible nombre de *Fusarium* séquencés pour les gènes RPB disponibles dans la base. Malgré tout, les pourcentages de similarité étant sensiblement différents, l'identification peut être réalisée.

Concernant le gène ITS, le problème principal est, comme pour la base Genbank, le grand nombre d'occurrences à fort pourcentage ne permettant pas toujours de discriminer les espèces. A noter que les résultats sont toutefois globalement meilleurs dans la base spécifique que dans la base GenBank.

Au regard de l'ensemble des résultats, le gène EF1 paraît être le gène le plus adapté à l'identification de ces moisissures en utilisant la base spécifique. En effet les résultats pour ce gène se rapprochent bien souvent des résultats idéaux : de fort pourcentage de similarité avec un nombre de propositions différentes proche de 1. Les résultats d'identifications avec EF1 sont meilleurs que ceux obtenus avec les autres gènes. De plus, ce gène relativement court (600 pb), est techniquement plus simple à séquencer que les gènes RPB qui nécessitent deux couples d'amorces. Nous corroborons donc les recommandations de O'Donnell, à savoir que si le schéma en trois gènes n'est pas réalisé, il est préférable de ne séquencer que EF1 [5].

3.4.2.3. Solution mixte

La principale insuffisance du gène ITS, quelle que soit la base de données utilisée, est le grand nombre d'occurrence à forte similarité. De ce fait, lorsque plusieurs espèces sont présentées, l'utilisateur ne sait laquelle choisir. Néanmoins, il ressort de cette étude que l'utilisation du gène ITS dans la base de données non spécifique GenBank n'est pas adaptée sauf en cas de *Fusarium oxysporum*. Par ailleurs, l'utilisation du séquençage de l'ITS dans la base de données spécifique paraît presque toujours adaptée sauf en cas de *Fusarium oxysporum*. Ainsi, sur les 33 *Fusarium* séquencés de cette étude, l'utilisation des deux bases de données en parallèle permet de se prononcer avec certitude sur toutes les espèces de *Fusarium* isolées. Cette stratégie d'identification présente l'avantage de ne pas avoir besoin

de recourir à des PCR spécifiques. Ainsi, lorsqu'une recherche d'infection fongique est réalisée sur un échantillon primaire par PCR panfongique (gène ITS) et qu'il est retrouvé un *Fusarium*, il ne paraît pas nécessaire de recourir à une amplification spécifique. En outre, un simple traitement supplémentaire de l'information via la banque de données spécifiques permet d'obtenir des résultats d'identification d'espèce tout à fait satisfaisant.

3.4.3. Proposition d'un logigramme pour l'identification de *Fusarium* au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Nancy

De l'ensemble des ces résultats il en résulte une proposition de logigramme :

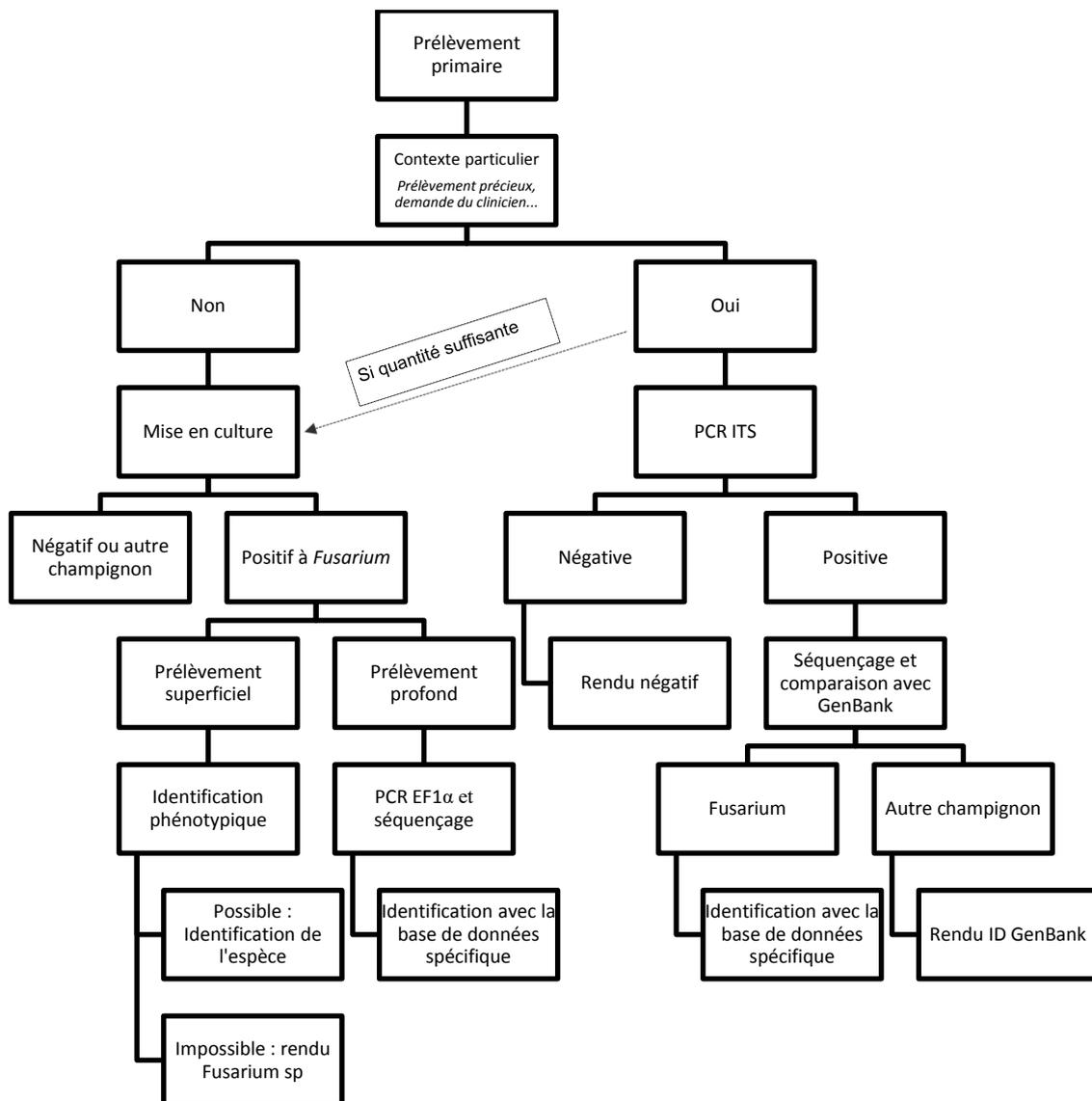


Figure 33 : Logigramme d'identification de *Fusarium* au laboratoire de Parasitologie-Mycologie

Conclusion générale

Les *Fusarium* sont des champignons mal connus et relativement peu étudiés surtout dans le milieu médical. Néanmoins, ces champignons sont responsables de diverses pathologies végétales, animales et humaines. La plupart du temps presque anodines, certaines fusarioses peuvent se révéler gravissimes notamment dans un contexte d'immunodépression. Au travers des deux axes de cette thèse, nous avons souhaité faire d'une part un état des lieux des infections à *Fusarium* au CHRU de Nancy et d'autre part évaluer ainsi qu'améliorer nos pratiques de laboratoire relatives à l'identification de ces moisissures. Il est évident que l'identification précise (jusqu'à l'espèce) et systématique de tous les *Fusarium* isolés au laboratoire quel que soit le prélèvement, n'est pas indispensable, mais dans certains cas (localisation profonde par exemple), l'identification d'espèce au niveau du complexe est intéressante.

A posteriori de ce travail quelques conclusions se sont imposées. Ainsi d'un point de vue épidémiologique, le principal enseignement réside dans la stagnation des infections à *Fusarium* (représentant en moyenne 0.48 % des hémocultures positives et 8.48 % des prélèvements positifs de phanères) à l'exception notable du nombre croissant de fusarioses ophtalmiques (en moyenne 21.6 % des prélèvements ophtalmiques mais avec de fortes disparités inter années). D'un point de vue pratique de laboratoire, trois leçons principales sont à retenir. La première porte sur l'identification phénotypique, celle-ci ne se trouve pas systématiquement bien corrélée à l'identification moléculaire, principalement en cas de *F. subglutinans*. La seconde concerne le gène EF1 α , il s'agit du gène présentant les meilleures performances pour l'identification d'espèce des champignons du genre *Fusarium*. La dernière, réside dans l'évaluation prometteuse de la base de données spécifique de *Fusarium*. Celle-ci présente plusieurs avantages, elle offre une classification actualisée des champignons en complexe d'espèce, et surtout, elle permet de suppléer aux insuffisances de la base GenBank en matière de séquençage ITS.

Au total, ce travail de thèse s'est donc inscrit dans une démarche de meilleure connaissance de l'épidémiologie locale ainsi qu'une démarche d'évaluation et d'amélioration des pratiques au laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Nancy.

Bibliographie

- [1] De Hoog S, Guarro J, Gén e J, and Figueras M, "Atlas of Clinical fungi v4.1.4." .
- [2] V. Lavarde and C. Hennequin, "Infections   « Fusarium », " *Httpwwwem-Premiumcomdatatraitescmc08-41944*.
- [3] D. I. Hawksworth, "A new dawn for the naming of fungi: impacts of decisions made in Melbourne in July 2011 on the future publication and regulation of fungal names," *IMA Fungus*, vol. 2, no. 2, pp. 155–162, Dec. 2011.
- [4] D. M. Geiser *et al.*, "One Fungus, One Name: Defining the Genus *Fusarium* in a Scientifically Robust Way That Preserves Longstanding Use," *Phytopathology*, vol. 103, no. 5, pp. 400–408, f evrier 2013.
- [5] K. O'Donnell *et al.*, "Internet-Accessible DNA Sequence Database for Identifying *Fusaria* from Human and Animal Infections," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 48, no. 10, pp. 3708–3718, Jan. 2010.
- [6] J. Guarro, "Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment," *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 32, no. 12, pp. 1491–1500, Dec. 2013.
- [7] M. C. Dignani and E. Anaissie, "Human fusariosis," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 10, pp. 67–75, Mar. 2004.
- [8] P. E. Nelson, M. C. Dignani, and E. J. Anaissie, "Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species.," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 7, no. 4, pp. 479–504, Oct. 1994.
- [9] D. Palmero, J. M. Rodr guez, M. de Cara, F. Camacho, C. Iglesias, and J. C. Tello, "Fungal microbiota from rain water and pathogenicity of *Fusarium* species isolated from atmospheric dust and rainfall dust," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 38, no. 1, pp. 13–20, Sep. 2010.
- [10] J. Swathi, K. M. Sowjanya, K. Narendra, and A. K. Satya, "Bioactivity Assay of an Isolated Marine *Fusarium* sps," *Int. J. Bio-Sci. Bio-Technol.*, vol. 5, no. 5, pp. 179–186, Oct. 2013.
- [11] D. Mongrain, L. Couture, and A. Comeau, "Natural occurrence of *Fusarium graminearum* on adult wheat midge and transmission to wheat spikes," *ResearchGate*, vol. 28, no. 1, pp. 173–180, Jan. 2000.
- [12] N. N. Zhdanova, V. A. Zakharchenko, V. V. Vember, and L. T. Nakonechnaya, "Fungi from Chernobyl: mycobiota of the inner regions of the containment structures of the damaged nuclear reactor," *Mycol. Res.*, vol. 104, no. 12, pp. 1421–1426, d ecembre 2000.
- [13] A. Debourgogne, J. Dorin, and M. Machouart, "Emerging infections due to filamentous fungi in humans and animals: only the tip of the iceberg?," *Environ. Microbiol. Rep.*, vol. 8, no. 3, pp. 332–342, juin 2016.
- [14] R. Dean *et al.*, "The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology," *Mol. Plant Pathol.*, vol. 13, no. 4, pp. 414–430, mai 2012.
- [15] M. P. McMullen and R. W. Stack, "Fusarium head blight (scab) of small grains," 2011.
- [16] D. C. M. Kulatunga, S. H. S. Dananjaya, B. K. Park, C.-H. Kim, J. Lee, and M. De Zoysa, "First report of *Fusarium oxysporum* species complex infection in zebrafish culturing system," *J. Fish Dis.*, Jul. 2016.
- [17] N. Zhang *et al.*, "Members of the *Fusarium solani* Species Complex That Cause Infections in Both Humans and Plants Are Common in the Environment," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 44, no. 6, pp. 2186–2190, Jun. 2006.
- [18] D. Triest, D. Pi rard, K. De Cremer, and M. Hendrickx, "*Fusarium musae* infected banana fruits as potential source of human fusariosis: May occur more frequently than we might think and hypotheses about infection," *Commun. Integr. Biol.*, vol. 9, no. 2, p. e1162934, Mar. 2016.
- [19] E. J. Anaissie *et al.*, "Fusariosis Associated with Pathogenic *Fusarium* Species Colonization of a Hospital Water System: A New Paradigm for the Epidemiology of

- Opportunistic Mold Infections," *Clin. Infect. Dis.*, vol. 33, no. 11, pp. 1871–1878, Jan. 2001.
- [20] M. Sautour *et al.*, "Fusarium species recovered from the water distribution system of a French university hospital," *Int. J. Hyg. Environ. Health*, vol. 215, no. 3, pp. 286–292, Apr. 2012.
- [21] V. Edel-Hermann *et al.*, "A clonal lineage of *Fusarium oxysporum* circulates in tap water of different French hospitals," *Appl. Environ. Microbiol.*, p. AEM.01939-16, Sep. 2016.
- [22] M. A. Ghannoum *et al.*, "Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals," *PLOS Pathog*, vol. 6, no. 1, p. e1000713, Jan. 2010.
- [23] P. K. Mukherjee *et al.*, "Oral Mycobiome Analysis of HIV-Infected Patients: Identification of *Pichia* as an Antagonist of Opportunistic Fungi," *PLoS Pathog.*, vol. 10, no. 3, Mar. 2014.
- [24] A. J. Scupham *et al.*, "Abundant and Diverse Fungal Microbiota in the Murine Intestine," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 72, no. 1, pp. 793–801, Jan. 2006.
- [25] M. J. Suhr, N. Banjara, and H. E. Hallen-Adams, "Sequence-based methods for detecting and evaluating the human gut mycobiome," *Lett. Appl. Microbiol.*, vol. 62, no. 3, pp. 209–215, Mar. 2016.
- [26] D. G. Ahearn *et al.*, "Fusarium keratitis and contact lens wear: facts and speculations," *Med. Mycol.*, vol. 46, no. 5, pp. 397–410, Jan. 2008.
- [27] P. K. Mukherjee, J. Chandra, C. Yu, Y. Sun, E. Pearlman, and M. A. Ghannoum, "Characterization of Fusarium Keratitis Outbreak Isolates: Contribution of Biofilms to Antimicrobial Resistance and Pathogenesis," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 53, no. 8, pp. 4450–4457, Jul. 2012.
- [28] D. G. Ahearn *et al.*, "Attachment to and penetration of conventional and silicone hydrogel contact lenses by *Fusarium solani* and *Ulocladium* sp. in vitro," *Cornea*, vol. 26, no. 7, pp. 831–839, Aug. 2007.
- [29] D. G. Ahearn *et al.*, "Relative in vitro rates of attachment and penetration of hydrogel soft contact lenses by haplotypes of fusarium," *Cornea*, vol. 28, no. 4, pp. 447–450, May 2009.
- [30] J. I. Pitt, "Toxigenic fungi: which are important?," *Med. Mycol.*, vol. 38, no. Supplement 1, pp. 17–22, Dec. 2000.
- [31] M. Nucci and E. Anaissie, "Fusarium infections in immunocompromised patients," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 4, pp. 695–704, Oct. 2007.
- [32] A. K. Gupta, R. Baran, and R. C. Summerbell, "Fusarium infections of the skin," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 2, pp. 121–128, Apr. 2000.
- [33] G. Antonissen *et al.*, "The Impact of Fusarium Mycotoxins on Human and Animal Host Susceptibility to Infectious Diseases," *Toxins*, vol. 6, no. 2, pp. 430–452, Jan. 2014.
- [34] A. Debourgogne and C. Hennequin, "Infections à Fusarium," 2015.
- [35] E. Mayayo, J. Guarro, and I. Pujol, "Endogenous endophthalmitis by *Fusarium solani*: an animal experimental model," *Med. Mycol.*, vol. 36, no. 5, pp. 249–253, Jan. 1998.
- [36] O. Lortholary *et al.*, "International Retrospective Analysis of 73 Cases of Invasive Fusariosis Treated with Voriconazole," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 10, pp. 4446–4450, Jan. 2010.
- [37] M. Nucci *et al.*, "Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and Fusarium infection," *Cancer*, vol. 98, no. 2, pp. 315–319, Jul. 2003.
- [38] S. Shoham and S. M. Levitz, "The immune response to fungal infections," *Br. J. Haematol.*, vol. 129, no. 5, pp. 569–582, juin 2005.
- [39] C. Legrand, E. Anaissie, R. Hashem, P. Nelson, G. P. Bodey, and J. Ro, "Experimental Fusarial Hyalohyphomycosis in a Murine Model," *J. Infect. Dis.*, vol. 164, no. 5, pp. 944–948, Jan. 1991.
- [40] D. P. G. Short, K. O'Donnell, N. Zhang, J. H. Juba, and D. M. Geiser, "Widespread Occurrence of Diverse Human Pathogenic Types of the Fungus *Fusarium* Detected in Plumbing Drains," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 49, no. 12, pp. 4264–4272, Dec. 2011.

- [41] S. C. Murray and R. P. R. Dawber, "Onychomycosis of toenails: orthopaedic and podiatric considerations," *Australas. J. Dermatol.*, vol. 43, no. 2, pp. 105–112, May 2002.
- [42] C. Gupta *et al.*, "Genotyping and In Vitro Antifungal Susceptibility Testing of *Fusarium* Isolates from Onychomycosis in India," *Mycopathologia*, vol. 181, no. 7–8, pp. 497–504, Aug. 2016.
- [43] O. Welsh, L. Vera-Cabrera, and E. Welsh, "Onychomycosis," *Clin. Dermatol.*, vol. 28, no. 2, pp. 151–159, Mar. 2010.
- [44] G. Moreno and R. Arenas, "Other fungi causing onychomycosis," *Clin. Dermatol.*, vol. 28, no. 2, pp. 160–163, Mar. 2010.
- [45] Gianni, Cerri, and Crosti, "Non-dermatophytic onychomycosis. An underestimated entity? A study of 51 cases," *Mycoses*, vol. 43, no. 1–2, pp. 29–33, Mar. 2000.
- [46] A. Tosti, B. M. Piraccini, and S. Lorenzi, "Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 42, no. 2 Pt 1, pp. 217–224, Feb. 2000.
- [47] A. K. Gupta, H. C. Jain, C. W. Lynde, G. N. Wateel, and R. C. Summerbell, "Prevalence and epidemiology of unsuspected onychomycosis in patients visiting dermatologists' offices in Ontario, Canada—a multicenter survey of 2001 patients," *Int. J. Dermatol.*, vol. 36, no. 10, pp. 783–787, Oct. 1997.
- [48] A. K. Gupta, C. Drummond-Main, E. A. Cooper, W. Brintnell, B. M. Piraccini, and A. Tosti, "Systematic review of nondermatophyte mold onychomycosis: Diagnosis, clinical types, epidemiology, and treatment," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 66, no. 3, pp. 494–502, Mar. 2012.
- [49] A. D. van Diepeningen, P. Feng, S. Ahmed, M. Sudhadham, S. Bunyaratavej, and G. S. de Hoog, "Spectrum of *Fusarium* infections in tropical dermatology evidenced by multilocus sequencing typing diagnostics," *Mycoses*, vol. 58, no. 1, pp. 48–57, Jan. 2015.
- [50] S. M. Hwang, M. K. Suh, and G. Y. Ha, "Onychomycosis Due to Nondermatophytic Molds," *Ann. Dermatol.*, vol. 24, no. 2, p. 175, 2012.
- [51] R. Baran, J. Faergemann, and R. J. Hay, "Superficial white onychomycosis—A syndrome with different fungal causes and paths of infection," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 57, no. 5, pp. 879–882, Nov. 2007.
- [52] D. He *et al.*, "Pathogenic Spectrum of Fungal Keratitis and Specific Identification of *Fusarium solani*," *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.*, vol. 52, no. 5, p. 2804, Apr. 2011.
- [53] A. M. S. Al-Hatmi *et al.*, "Keratitis by *Fusarium temperatum*, a novel opportunist," *BMC Infect. Dis.*, vol. 14, Nov. 2014.
- [54] E. C. Alfonso, "Genotypic identification of *Fusarium* species from ocular sources: comparison to morphologic classification and antifungal sensitivity testing (an AOS thesis)," *Trans. Am. Ophthalmol. Soc.*, vol. 106, pp. 227–239, 2008.
- [55] J. D. Chidambaram *et al.*, "Prospective Study of the Diagnostic Accuracy of the In Vivo Laser Scanning Confocal Microscope for Severe Microbial Keratitis," *Ophthalmology*, Aug. 2016.
- [56] M. Słowik, M. Biernat, D. Urbaniak-Kujda, K. Kapelko-Słowik, and M. Misiuk-Hojło, "Mycotic Infections of the Eye," *Adv. Clin. Exp. Med.*, vol. 24, no. 6, pp. 1113–1117, 2015.
- [57] F. Nucci, S. Nouér, D. Capone, E. Anaissie, and M. Nucci, "Fusariosis," *Semin. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 36, no. 05, pp. 706–714, Sep. 2015.
- [58] R. Pai, R. Bloor, K. Shreevidya, and D. Shenoy, "*Fusarium solani*: An Emerging Fungus in Chronic Diabetic Ulcer," *J. Lab. Physicians*, vol. 2, no. 1, pp. 37–39, 2010.
- [59] Y. Nakamura *et al.*, "Deep cutaneous infection by *Fusarium solani* in a healthy child: Successful treatment with local heat therapy," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 56, no. 5, pp. 873–877, May 2007.
- [60] M. Delia *et al.*, "Fusariosis in a Patient with Acute Myeloid Leukemia: A Case Report and Review of the Literature," *Mycopathologia*, vol. 181, no. 5–6, pp. 457–463, Jun. 2016.

- [61] R. J. Hay, "Fusarium infections of the skin," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 20, no. 2, pp. 115–117, 2007.
- [62] M. S. Wheeler, M. R. McGinnis, W. A. Schell, and D. H. Walker, "Fusarium infection in burned patients," *Am. J. Clin. Pathol.*, vol. 75, no. 3, pp. 304–311, Mar. 1981.
- [63] "Orphanet: Mycétome." [Online]. Available: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=FR&Expert=2583. [Accessed: 23-Sep-2016].
- [64] V. J. Katkar, S. S. Tankhiwale, and A. Kurhade, "FUSARIUM SOLONI MYCETOMA," *Indian J. Dermatol.*, vol. 56, no. 3, pp. 315–317, 2011.
- [65] A. Bonifaz *et al.*, "Mycetoma: Experience of 482 Cases in a Single Center in Mexico," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 8, no. 8, Aug. 2014.
- [66] K. S. Backman, M. Roberts, and R. Patterson, "Allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Fusarium vasinfectum*," *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, vol. 152, no. 4 Pt 1, pp. 1379–1381, Oct. 1995.
- [67] R. M. Ramirez and R. L. Jacobs, "Hypersensitivity pneumonitis by *Fusarium vasinfectum* in a home environment," *J. Allergy Clin. Immunol. Pract.*, vol. 2, no. 4, pp. 483–484, Aug. 2014.
- [68] D. G. Rojas-Tula *et al.*, "Endobronchial cryotherapy for a mycetoma," *J. Bronchol. Interv. Pulmonol.*, vol. 20, no. 4, pp. 330–332, Oct. 2013.
- [69] C.-C. Su, H.-J. Hsu, J.-J. Wu, and C.-W. Chou, "Diagnosis of fusariosis in urine cytology," *J. Clin. Pathol.*, vol. 60, no. 4, pp. 422–424, Apr. 2007.
- [70] M. Sierra-Hoffman, S. Paltiyevich-Gibson, J. L. Carpenter, and D. L. Hurley, "Fusarium osteomyelitis: case report and review of the literature," *Scand. J. Infect. Dis.*, vol. 37, no. 3, pp. 237–240, 2005.
- [71] O. Kassar, M. Charfi, H. Trabelsi, R. Hammami, and M. Elloumi, "Fusarium solani endocarditis in an acute leukemia patient," *Médecine Mal. Infect.*, vol. 46, no. 1, pp. 57–59, Feb. 2016.
- [72] M. Nucci and E. Anaissie, "Fusarium Infections in Immunocompromised Patients," *Clin. Microbiol. Rev.*, vol. 20, no. 4, pp. 695–704, Oct. 2007.
- [73] M. C. Dignani and E. Anaissie, "Human fusariosis," *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 10 Suppl 1, pp. 67–75, Mar. 2004.
- [74] E. M. Marom, A. M. Holmes, J. F. Bruzzi, M. T. Truong, P. J. O'Sullivan, and D. P. Kontoyiannis, "Imaging of pulmonary fusariosis in patients with hematologic malignancies," *AJR Am. J. Roentgenol.*, vol. 190, no. 6, pp. 1605–1609, Jun. 2008.
- [75] C. T. Cho, T. S. Vats, J. T. Lowman, J. W. Brandsberg, and F. E. Tosh, "Fusarium solani infection during treatment for acute leukemia," *J. Pediatr.*, vol. 83, no. 6, pp. 1028–1031, Dec. 1973.
- [76] O. Lortholary *et al.*, "International Retrospective Analysis of 73 Cases of Invasive Fusariosis Treated with Voriconazole," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 54, no. 10, pp. 4446–4450, Oct. 2010.
- [77] V. R. Aquino, E. B. Verçosa, G. Falhauber, L. W. Lunardi, L. Silla, and A. C. Pasqualotto, "Distribution of filamentous fungi causing invasive fungal disease at the Haematological Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil," *Braz. J. Infect. Dis. Off. Publ. Braz. Soc. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 3, pp. 277–280, Jun. 2010.
- [78] H.-C. Hsiue, S.-Y. Ruan, Y.-L. Kuo, Y.-T. Huang, and P.-R. Hsueh, "Invasive infections caused by non-Aspergillus moulds identified by sequencing analysis at a tertiary care hospital in Taiwan, 2000-2008," *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 16, no. 8, pp. 1204–1206, Aug. 2010.
- [79] C. L. Halliday *et al.*, "Antifungal susceptibilities of non-Aspergillus filamentous fungi causing invasive infection in Australia: support for current antifungal guideline recommendations," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 48, no. 4, pp. 453–458, Oct. 2016.
- [80] M. Delia *et al.*, "Fusariosis in a Patient with Acute Myeloid Leukemia: A Case Report and Review of the Literature," *Mycopathologia*, vol. 181, no. 5–6, pp. 457–463, 2016.
- [81] L. K. Ammari, J. M. Puck, and K. L. McGowan, "Catheter-related *Fusarium solani* fungemia and pulmonary infection in a patient with leukemia in remission," *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 16, no. 1, pp. 148–150, Jan. 1993.

- [82] M. Jossi, J. Ambrosioni, M. Macedo-Vinas, and J. Garbino, "Invasive fusariosis with prolonged fungemia in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature," *Int. J. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 4, pp. e354–e356, Apr. 2010.
- [83] J. R. Perfect and W. A. Schell, "The new fungal opportunists are coming," *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 22 Suppl 2, pp. S112–118, May 1996.
- [84] H. E. Jensen, J. Salonen, and T. O. Ekfors, "The use of immunohistochemistry to improve sensitivity and specificity in the diagnosis of systemic mycoses in patients with haematological malignancies," *J. Pathol.*, vol. 181, no. 1, pp. 100–105, Jan. 1997.
- [85] B. A. Summerell, B. Salleh, and J. F. Leslie, "A utilitarian approach to *Fusarium* identification," *Plant Dis.*, vol. 87, no. 2, pp. 117–128, 2003.
- [86] A. Gravet and G. Camdessoucens-Miehé, "Application de la spectrométrie de masse à la microbiologie," [Httpwwwwem-Premiumcomdatarevues1773035X0041043755](http://www.wem-premium.com/data/revues/1773035X0041043755), Dec. 2011.
- [87] A. Alanio, "La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en mycologie clinique : avantages réels, écueils potentiels," *J. Anti-Infect.*, vol. 15, no. 2, pp. 71–82, Jun. 2013.
- [88] C. Marinach-Patrice *et al.*, "Use of mass spectrometry to identify clinical *Fusarium* isolates," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 15, no. 7, pp. 634–642, juillet 2009.
- [89] D. Triest *et al.*, "Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight Mass Spectrometry for Identification of Molds of the *Fusarium* Genus," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 53, no. 2, pp. 465–476, Feb. 2015.
- [90] R. A. Oechsler *et al.*, "Utility of molecular sequence analysis of the ITS rRNA region for identification of *Fusarium* spp. from ocular sources," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 50, no. 5, pp. 2230–2236, May 2009.
- [91] A. D. van Diepeningen, B. Brankovics, J. Iltes, T. A. J. van der Lee, and C. Waalwijk, "Diagnosis of *Fusarium* Infections: Approaches to Identification by the Clinical Mycology Laboratory," *Curr. Fungal Infect. Rep.*, vol. 9, no. 3, pp. 135–143, Sep. 2015.
- [92] A. Lau *et al.*, "Development and Clinical Application of a Panfungal PCR Assay To Detect and Identify Fungal DNA in Tissue Specimens," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 45, no. 2, pp. 380–385, Feb. 2007.
- [93] N. S. Chandra *et al.*, "Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 90, no. 5, pp. 1625–1639, Jun. 2011.
- [94] A. Alastruey-Izquierdo, M. Cuenca-Estrella, A. Monzon, E. Mellado, and J. L. Rodríguez-Tudela, "Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 61, no. 4, pp. 805–809, Feb. 2008.
- [95] K. O'Donnell *et al.*, "Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria," *Fungal Genet. Biol.*, vol. 52, pp. 20–31, Mar. 2013.
- [96] Z. Odabasi *et al.*, "Beta-D-glucan as a diagnostic adjunct for invasive fungal infections: validation, cutoff development, and performance in patients with acute myelogenous leukemia and myelodysplastic syndrome," *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.*, vol. 39, no. 2, pp. 199–205, Jul. 2004.
- [97] S. Bretagne, "Antigènes fongiques en réanimation : tests disponibles et état des lieux," [Httpwwwwem-Premiumcomdatarevues162406930016000307000345](http://www.wem-premium.com/data/revues/162406930016000307000345), Jun. 2007.
- [98] A. M. Tortorano *et al.*, "Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the Aspergillus Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay," *J. Clin. Microbiol.*, vol. 50, no. 3, pp. 1051–1053, Mar. 2012.
- [99] E. M. Marom, A. M. Holmes, J. F. Bruzzi, M. T. Truong, P. J. O'Sullivan, and D. P. Kontoyiannis, "Imaging of pulmonary fusariosis in patients with hematologic malignancies," *AJR Am. J. Roentgenol.*, vol. 190, no. 6, pp. 1605–1609, Jun. 2008.
- [100] A. Alastruey-Izquierdo, M. Cuenca-Estrella, A. Monzón, E. Mellado, and J. L. Rodríguez-Tudela, "Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods," *J. Antimicrob. Chemother.*, vol. 61, no. 4, pp. 805–809, Jan. 2008.

- [101] A. Debourgogne, S. de Hoog, A. Lozniewski, and M. Machouart, "Amphotericin B and voriconazole susceptibility profiles for the *Fusarium solani* species complex: comparison between the E-test and CLSI M38-A2 microdilution methodology," *ResearchGate*, vol. 31, no. 4, pp. 615–8, Jul. 2011.
- [102] S. K. Katiyar and T. D. Edlind, "Role for Fks1 in the intrinsic echinocandin resistance of *Fusarium solani* as evidenced by hybrid expression in *Saccharomyces cerevisiae*," *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 53, no. 5, pp. 1772–1778, May 2009.
- [103] S. J. Taj-Aldeen *et al.*, "In vitro resistance of clinical *Fusarium* species to amphotericin B and voriconazole using the EUCAST antifungal susceptibility method," *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 85, no. 4, pp. 438–443, Aug. 2016.
- [104] EUCAST, "European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST). Antifungal Agents Breakpoint tables for interpretation of MICs. Version 8.1," Mar. 2017.
- [105] A. M. Tortorano *et al.*, "ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others," *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, vol. 20 Suppl 3, pp. 27–46, Apr. 2014.
- [106] S. Córdoba, L. Rodero, W. Vivot, R. Abrantes, G. Davel, and R. G. Vitale, "In vitro interactions of antifungal agents against clinical isolates of *Fusarium* spp.," *Int. J. Antimicrob. Agents*, vol. 31, no. 2, pp. 171–174, Feb. 2008.
- [107] S. Inano, N. Arima, M. Kimura, and J. Iida, "Combination therapy of voriconazole and terbinafine for disseminated fusariosis: case report and literature review," *J. Infect. Chemother.*, vol. 19, no. 6, pp. 1173–1180, 2013.
- [108] J. G. Bueno, C. Martinez, B. Zapata, G. Sanclemente, M. Gallego, and A. C. Mesa, "In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis," *Clin. Exp. Dermatol.*, vol. 35, no. 6, pp. 658–663, Aug. 2010.
- [109] F. Baudraz-Rosselet, C. Ruffieux, M. Lurati, O. Bontems, and M. Monod, "Onychomycosis insensitive to systemic terbinafine and azole treatments reveals non-dermatophyte moulds as infectious agents," *Dermatol. Basel Switz.*, vol. 220, no. 2, pp. 164–168, 2010.
- [110] A. Tosti, B. M. Piraccini, and S. Lorenzi, "Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases," *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 42, no. 2 Pt 1, pp. 217–224, Feb. 2000.
- [111] G. F. Yavas *et al.*, "Antifungal efficacy of voriconazole, itraconazole and amphotericin b in experimental *Fusarium solani* keratitis," *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.*, vol. 246, no. 2, pp. 275–279, Feb. 2008.
- [112] G. Touvron *et al.*, "Efficacité de l'amphotéricine B liposomale dans le traitement d'une kératite à *Fusarium solani* résistante," *J. Fr. Ophthalmol.*, vol. 32, no. 10, pp. 721–726, Dec. 2009.
- [113] X.-H. Dong, W.-J. Gao, and X.-P. He, "Antifungal efficacy of natamycin in experimental *Fusarium solani* keratitis," *Int. J. Ophthalmol.*, vol. 5, no. 2, p. 143, 2012.
- [114] W. Behrens-Baumann *et al.*, "Benefit of polyhexamethylene biguanide in *Fusarium* keratitis," *Ophthalmic Res.*, vol. 48, no. 4, pp. 171–176, 2012.
- [115] Y. A.-G. Mahmoud, "In vitro and in vivo antifungal activity of cetrimide (cetyltrimethyl ammonium bromide) against fungal keratitis caused by *Fusarium solani*," *Mycoses*, vol. 50, no. 1, pp. 64–70, Jan. 2007.
- [116] H.-C. Lin, P.-H. Chu, Y.-H. Kuo, and S.-C. Shen, "Clinical experience in managing *Fusarium solani* keratitis," *Int. J. Clin. Pract.*, vol. 59, no. 5, pp. 549–554, mai 2005.
- [117] M. Muhammed, H. Carneiro, J. Coleman, and E. Mylonakis, "The challenge of managing fusariosis," *Virulence*, vol. 2, no. 2, pp. 91–96, Mar. 2011.
- [118] E. I. Boutati and E. J. Anaissie, "Fusarium, a Significant Emerging Pathogen in Patients With Hematologic Malignancy: Ten Years' Experience at a Cancer Center and Implications for Management," *Blood*, vol. 90, no. 3, pp. 999–1008, Aug. 1997.
- [119] C. Hennequin *et al.*, "Invasive *Fusarium* infections: a retrospective survey of 31 cases. The French 'Groupe d'Etudes des Mycoses Opportunistes' GEMO," *J. Med. Vet.*

Mycol. Bi-Mon. Publ. Int. Soc. Hum. Anim. Mycol., vol. 35, no. 2, pp. 107–114, Apr. 1997.

- [120] “Orphanet: Maladie de Wolman.” [Online]. Available: http://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?lng=FR&Expert=75233. [Accessed: 23-Jan-2017].

DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 12/09/17

<p>DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE</p> <p>présenté par : M. Benoit THOMAS</p> <p><u>Sujet</u> : « Etude épidémiologique des infections à <i>Fusarium</i> au CHRU de Nancy sur 10 ans et identification moléculaire d'espèces. »</p> <p><u>Jury</u> :</p> <p>Président : M. Christophe GANTZER, Professeur Directeur : Mme. Anne DEBOURGOGNE, Maître de Conférences Juges : Mme Marie-Claire MACHOUART, Professeur Mme Véronique DUVAL, Pharmacien</p>	<p>Vu, Nancy, le 15/06/17</p> <p>Le Président du Jury Directeur de Thèse</p> <p>M. GANTZER Christophe Mme DEBOURGOGNE Anne</p>
<p>Vu et approuvé, Nancy, le 16.06.2017</p> <p>Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,</p> <p> Francine PAULUS</p>	<p>Vu, Nancy, le 3.07.2017</p> <p>Le Président de l'Université de Lorraine,</p> <p> Pierre MUTZENHARDT</p> <p>N° d'enregistrement : 9907</p>

N° d'identification :

TITRE

Etude épidémiologique des infections à *Fusarium* au CHRU de Nancy sur 10 ans et identification moléculaire d'espèces.

Thèse soutenue le 12 septembre 2017

Par Benoît THOMAS

RESUME :

Les champignons du genre *Fusarium* sont des moisissures largement distribuées dans l'environnement mais ne sont pas au premier plan des pathologies infectieuses humaines. Ainsi, les *Fusarium* sont beaucoup plus étudiés sur le volet environnemental que médical. Cette thèse, centrée sur l'intérêt médical, vise plusieurs objectifs. Outre une revue de la littérature, le premier objectif est épidémiologique : il s'agit de déterminer l'infectiosité locale au CHRU de Nancy et son évolution sur une période de 10 ans. Le deuxième objectif est pratique : il vise à évaluer et à améliorer la démarche diagnostique du laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHRU de Nancy en ce qui concerne l'identification des champignons du genre *Fusarium*. Après ce travail, un certain nombre de nos *a priori* ont été confirmés mais certaines surprises se sont révélées *a posteriori*. Ainsi d'un point de vue épidémiologique, un nombre croissant d'infection oculaire à *Fusarium* a été relevé et au niveau des pratiques de laboratoire, l'utilisation du gène EF1 α et de la base de données spécifique à *Fusarium* s'avère prometteuse.

Ce travail de thèse s'est donc inscrit dans une démarche de meilleure connaissance de l'épidémiologie locale et a permis une évaluation et une amélioration des pratiques au laboratoire de Mycologie du CHRU de Nancy.

MOTS CLES : *Fusarium*, épidémiologie, identification moléculaire, EF1 α , RPB1, RPB2, ITS

Directeurs de thèse	Intitulé du laboratoire	Nature
Professeur Christophe Gantzer, PU Docteur Anne Debourgogne, MCU-PH	Laboratoire de Parasitologie- Mycologie du CHRU de Nancy	Expérimentale <input checked="" type="checkbox"/>
		Bibliographique <input type="checkbox"/>
		Thème <input type="checkbox"/> 5

Thèmes

1 – Sciences fondamentales
3 – Médicament
⑤ - Biologie

2 – Hygiène/Environnement
4 – Alimentation – Nutrition
6 – Pratique professionnelle