



HAL
open science

Typage moléculaire du complexe d'espèces *Fusarium solani* et détermination de son mécanisme de résistance au voriconazole

Anne Debourgogne

► **To cite this version:**

Anne Debourgogne. Typage moléculaire du complexe d'espèces *Fusarium solani* et détermination de son mécanisme de résistance au voriconazole. Médecine humaine et pathologie. Université de Lorraine, 2013. Français. NNT : 2013LORR0021 . tel-01749382

HAL Id: tel-01749382

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749382v1>

Submitted on 29 Mar 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-theses-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>



Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Anne DEBOURGOGNE**

**Typage moléculaire du complexe d'espèces
Fusarium solani et détermination de son mécanisme
de résistance au voriconazole**

29 mars 2013

Membres du jury :

Rapporteurs :	Monsieur Frédéric DALLE	Professeur, Université de Bourgogne, Dijon
	Monsieur Jean MENOTTI	Docteur, Université Paris Diderot
Examineurs :	Monsieur Alain LOZNIEWSKI	Professeur, Université de Lorraine,
		Directeur de thèse
	Madame Marie MACHOUART	Docteur, Université de Lorraine,
		Co-directeur de thèse

**EA 4369 RHEM, Relation Hôte Environnement Micro-organismes
EA SIMPA, Stress Immunité et Pathogènes (depuis 2013)**

REMERCIEMENTS

A Monsieur le Professeur Frédéric DALLE

Vous m'avez fait le grand honneur de présider le jury de ce travail et de m'accorder de votre temps.

Votre présence me rappelle des souvenirs dijonnais et permet de mettre en perspective le chemin parcouru.

Veillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A Monsieur le Docteur Jean MENOTTI

Vous m'avez fait l'honneur de porter un jugement averti sur ce travail.

Veillez accepter ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères.

A Monsieur le Professeur Alain LOZNIEWSKI

Vous avez accepté de diriger ce travail dans un esprit d'ouverture et de me faire confiance professionnellement.

Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

Madame le Docteur Marie MACHOUART

Tu as accepté de diriger cette thèse et de me guider dans mon parcours professionnel.

Tes connaissances, tes conseils et ta disponibilité m'ont accompagné lors de ce bout de chemin nancéen.

Sois assurée de ma sincère reconnaissance et de mon amitié.

A l'ensemble du personnel du laboratoire de Parasitologie / Mycologie

Merci pour votre accueil chaleureux et votre soutien quotidien

A l'ensemble de l'équipe de recherche de la faculté de Médecine

Merci pour ce cocon si ressourçant et coloré avec tendresse

A mes amis

A ma famille

A mes parents

Pour leur amour et leur soutien sans faille tout au long de ces années d'études

Merci d'avoir respecté mes choix personnels et professionnels

Je vous dédie cette thèse

TABLE DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS	2
TABLE DES MATIERES	5
TABLE DES ILLUSTRATIONS	11
Figures	11
Tableaux	13

PARTIE I :

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE : LE COMPLEXE D'ESPECES *FUSARIUM SOLANI* ET LES FUSARIOSES HUMAINES

TAXINOMIE	20
ECOLOGIE	23
MYCOLOGIE	25
Aspects morphologiques	25
Métabolites secondaires	32
Caractères moléculaires	33
PHYSIOPATHOLOGIE	35
Pouvoir pathogène	35
Aspects immunitaires	37
CLINIQUE	39
Colonisation	39

Infections superficielles.....	40
<i>Onychomycoses</i>	40
<i>Mycétomes</i>	45
<i>Kératites</i>	45
Infections profondes localisées à un seul organe	53
<i>Infections cutanées</i>	53
<i>Sinusites</i>	54
<i>Localisations atypiques</i>	54
Infections disséminées.....	55
DIAGNOSTIC	58
Diagnostic de l'infection	58
<i>Diagnostic direct</i>	58
<i>Biologie moléculaire</i>	60
<i>Immunodiagnostic</i>	61
<i>Imagerie</i>	62
Identification de l'espèce responsable de l'infection	63
<i>Mycologie</i>	63
<i>Biologie moléculaire</i>	70
<i>Spectrométrie de masse</i>	72
Typage moléculaire	73
TRAITEMENT	75
Profil de sensibilité aux antifongiques	75
Stratégie thérapeutique	80

<i>Onychomycoses</i>	80
<i>Kératites</i>	81
<i>Infections profondes ou disséminées</i>	82

PARTIE II :

TYPAGE MOLECULAIRE DU COMPLEXE D'ESPECES *FUSARIUM SOLANI*

CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	90
PROBLEMATIQUE	92
MATERIELS & METHODES.....	93
Souches du complexe d'espèces <i>Fusarium solani</i> étudiées	93
Choix des loci d'intérêt pour le développement d'un schéma de MLST.....	97
Etapes du processus analytique	98
<i>Extraction d'ADN</i>	98
<i>Amplification</i>	98
<i>Séquençage</i>	101
<i>Analyse des polymorphismes</i>	102
Validation analytique de la méthode	103
<i>Pouvoir discriminant</i>	103
<i>Efficacité de typage d'un locus</i>	103
<i>Stabilité et reproductibilité</i>	104
Analyse phylogénique	105

<i>Détermination de l'espèce phylogénétique et de l'haplotype</i>	105
<i>Pouvoir de résolution</i>	106
RESULTATS	107
Développement d'une méthode de MLST pour le complexe d'espèces <i>Fusarium solani</i> .	107
<i>Sélection des loci d'intérêt</i>	107
<i>Validation de la méthode de MLST</i>	111
Pouvoir discriminant de la méthode de MLST	111
Détermination de l'espèce phylogénétique et de l'haplotype des isolats de la population test	118
Comparaison des deux techniques de typage moléculaire	120
<i>Comparaison de la résolution phylogénique</i>	120
<i>Comparaison du pouvoir discriminant</i>	123
<i>Proposition d'une méthode consensus</i>	127
Comparaison des caractéristiques moléculaires de souches cliniques et végétales du complexe d'espèces <i>Fusarium solani</i>	130
DISCUSSION	132

PARTIE III :

EXPLORATION DE LA RESISTANCE DU COMPLEXE D'ESPECES *FUSARIUM SOLANI* AU VORICONAZOLE

CONTEXTE SCIENTIFIQUE.....	138
OBJECTIFS	140
MATERIELS & METHODES.....	141

Détermination des CMI du complexe d'espèces <i>Fusarium solani</i> au voriconazole et à l'amphotéricine B	141
<i>Souches étudiées</i>	141
<i>Molécules antifongiques</i>	141
<i>Préparation de l'inoculum</i>	142
<i>Méthode en microdilution CLSI M38-A2</i>	142
<i>Méthode e-test</i>	143
<i>Analyse des données</i>	143
Résistance par efflux	144
<i>Isolats</i>	144
<i>Agents bloqueurs d'efflux</i>	144
<i>Détermination des CMI</i>	145
Résistance par mutation de la cible CYP51	146
<i>Souches étudiées</i>	146
<i>Gènes cibles</i>	146
<i>Séquençage de cyp51</i>	147
<i>Analyse des polymorphismes en acides aminés</i>	148
RESULTATS	149
Détermination des CMI du complexe d'espèces <i>Fusarium solani</i> au voriconazole et à l'amphotéricine B	149
<i>Méthode CLSI M38-A2</i>	149
<i>Méthode e-test</i>	150
<i>Concordance des deux méthodes</i>	151
<i>Analyse des CMI selon les caractéristiques des isolats</i>	153

Résistance par efflux	156
Résistance par mutation de la cible CYP51	157
<i>CYP51 A</i>	157
<i>CYP51 B</i>	161
<i>CYP51 C</i>	163
DISCUSSION	165

CONCLUSION & PERSPECTIVES

BIBLIOGRAPHIE

ANNEXES

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Figures

Figure 1 : Terminologie pour décrire la morphologie du genre <i>Fusarium</i> _____	26
Figure 2 : Structure microscopique de <i>Fusarium solani</i> CBS 490.63 _____	28
Figure 3 : Aspect macroscopique de <i>Fusarium solani</i> CBS 224.34 _____	29
Figure 4 : Macroconidies _____	29
Figure 5 : Monophialides _____	30
Figure 6 : Microconidies _____	30
Figure 7 : Chlamydospores _____	31
Figure 8 : Différentes voies d'infection de l'ongle [Baran et al., 2007](63) _____	41
Figure 9 : Atteinte proximale de l'ongle [Tosti et al., 2000](60) _____	42
Figure 10 : Atteinte distale de l'ongle [Tosti et al., 2000](60) _____	43
Figure 11 : Mélanonychie à <i>Fusarium solani</i> [Lee et al., 2002](64) _____	43
Figure 12 : Observation à la lampe à fente d'une kératite à <i>Fusarium solani</i> [Brasnu et al., 2007](78) _____	47
Figure 13 : Examen direct (coloration de Gram) d'une kératite à <i>Fusarium solani</i> (les filaments mycéliens sont représentés par la flèche blanche) [Brasnu et al., 2007](78) _____	47
Figure 14 : Observation en microscopie confocale in vivo d'une kératite à <i>Fusarium solani</i> (les filaments mycéliens sont représentés par les flèches blanches et les cellules inflammatoires par la flèche noire) [Brasnu et al., 2007](78) _____	48
Figure 15 : Distribution des cultures positives à <i>Fusarium</i> [Gower et al., 2010](89) _____	50
Figure 16 : Lésion ulcéro-nécrotique à <i>Fusarium solani</i> [Pérez et al., 2007](98) _____	53
Figure 17 : Lésions cutanées lors d'une fusariose disséminée [Labois et al., 2011](118) _____	56
Figure 18 : Eléments fongiques de <i>Fusarium</i> lors d'un examen anatomo-pathologique coloré à l'HE [Montone et al. 2009](122) _____	59
Figure 19 : Fréquence des complexes d'espèces de <i>Fusarium</i> parmi 717 isolats cliniques [Short et al., 2011] (18) _____	63
Figure 20 : Distinction morphologique des 4 principales espèces de <i>Fusarium</i> _____	67
Figure 21 : Microconidies en chaînes de <i>Fusarium verticilloïdes</i> [de Hoog et al., 2011](2) _____	68
Figure 22 : Monophialides de <i>Fusarium verticilloïdes</i> [de Hoog et al., 2011](2) _____	68
Figure 23 : Polyphialides de <i>Fusarium proliferatum</i> [de Hoog et al., 2011](2) _____	69
Figure 24 : Monophialides courtes de <i>Fusarium oxysporum</i> [de Hoog et al., 2011](2) _____	69

Figure 25 : Monophialides longues de <i>Fusarium solani</i> [de Hoog et al., 2011](2)	69
Figure 26 : Utilité des différents loci dans l'identification des principaux complexes d'espèces de <i>Fusarium</i> [Balajee et al., 2009](138)	71
Figure 27 : Relation entre le pouvoir discriminant et le nombre de locus utilisés pour différencier des isolats de FSSC	112
Figure 28 : Placement phylogénétique des 50 souches de FSSC typées dans cette étude (en rouge), parmi les espèces phylogénétiques de référence définies par O'Donnell [O'Donnell et al., 2008](6).	119
Figure 29 : Arbre phylogénétique obtenu grâce à l'analyse des 5 nouveaux marqueurs (ACC, ICL, GDP, MDP, SOD)	121
Figure 30 : Arbre phylogénétique obtenu grâce à l'analyse des 3 gènes traditionnellement utilisés pour FSSC (EF1 α , ITS-nuLSU, RPB2)	122
Figure 31 : Arbre phylogénétique obtenu grâce à l'analyse par le schéma consensus à 8 loci	129
Figure 32 : Arbre phylogénétique obtenu grâce à l'analyse par le schéma consensus à 8 loci en distinguant les souches cliniques (en rose) des souches végétales (en vert)	131
Figure 33 : Répartition des CMI de 48 isolats de FSSC déterminées par la technique CLSI pour l'amphotéricine B et le voriconazole	150
Figure 34 : Répartition des CMI de 48 isolats de FSSC déterminées par la technique E-test pour l'amphotéricine B et le voriconazole	151
Figure 35 : Distribution des CMI en fonction de l'origine des isolats pour l'amphotéricine B (médiane en trait plein et mode en pointillé)	1
Figure 36 : Distribution des CMI en fonction de l'origine des isolats pour le voriconazole (médiane en trait plein et mode en pointillé)	1

Tableaux

<i>Tableau 1 : Classification taxinomique de Fusarium solani.....</i>	<i>21</i>
<i>Tableau 2 : Clé d'identification des espèces du genre Fusarium [de Hoog et al., 2011](2).....</i>	<i>65</i>
<i>Tableau 3 : Synthèse des différentes études de sensibilité aux antifongiques pour le complexe d'espèces Fusarium solani</i>	<i>75</i>
<i>Tableau 4 : Recommandations pour la prise en charge d'une fusariose invasive [Nucci et al., 2007](11).....</i>	<i>83</i>
<i>Tableau 5 : Référence CBS et caractéristiques épidémiologiques de la population de FSSC étudiée.....</i>	<i>94</i>
<i>Tableau 6 : Amorces utilisées et taille des amplicons.....</i>	<i>100</i>
<i>Tableau 7 : Origine des loci analysés et motifs d'exclusion / inclusion du schéma de MLST de FSSC.....</i>	<i>108</i>
<i>Tableau 8 : Caractéristiques des 5 loci étudiés</i>	<i>110</i>
<i>Tableau 9 : Caractéristiques et génotypes des 51 isolats de FSSC de la population test étudiée pour le développement du schéma de MLST</i>	<i>113</i>
<i>Tableau 10 : Caractéristiques moléculaires des 50 isolats typés en fonction de la technique utilisée</i>	<i>124</i>
<i>Tableau 11 : Caractéristiques des 5 loci étudiés</i>	<i>127</i>
<i>Tableau 12 : Contribution de chaque locus au schéma consensus à 8 loci</i>	<i>128</i>
<i>Tableau 13 : Amorces utilisées et taille des amplicons.....</i>	<i>147</i>
<i>Tableau 14 : Caractéristiques des CMI d'une population de 48 isolats de FSSC déterminées par 2 méthodes : CLSI M38-A2 et E-test</i>	<i>152</i>
<i>Tableau 15 : Distribution des divergences de dilutions entre les CMI pour les deux techniques utilisées : CLSI M38-A2 et E-test</i>	<i>152</i>
<i>Tableau 16 : Moyenne des CMI en fonction de l'origine des isolats et de la technique utilisée</i>	<i>154</i>
<i>Tableau 17 : Détermination des CMI au voriconazole en présence d'agents bloqueurs d'efflux</i>	<i>156</i>
<i>Tableau 18 : Polymorphismes en acides aminés de la protéine CYP51A.....</i>	<i>158</i>
<i>Tableau 19 : Polymorphismes en acides aminés de la protéine CYP51B.....</i>	<i>161</i>
<i>Tableau 20 : Polymorphismes en acides aminés de la protéine CYP51C.....</i>	<i>163</i>

TABLE DES ANNEXES

Annexe 1 : Référence GenBank des loci séquencés lors du développement du schéma de MLST

Annexe 2 : Référence GenBank des loci utilisés en phylogénie ou séquencés (en gras) lors de la comparaison des schémas de typage

Annexe 3 : Debourgogne A, Gueidan C, Hennequin C, Contet-Audonneau N, de Hoog S, Machouart M. Development of a new MLST scheme for differentiation of *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) isolates. *Journal of Microbiological Methods* 2010; 82(3) : 319-323

Annexe 4 : Debourgogne A, Gueidan C, de Hoog S, Lozniewski A, Machouart M. Comparison of two DNA sequence-based typing schemes for the *Fusarium solani* Species Complex and proposal of a new consensus method. *Journal of Microbiological Methods* 2012; 91(1): 65-72.

Annexe 5 : Debourgogne A, De Hoog S, Lozniewski A, Machouart M. Amphotericin B and voriconazole susceptibility profiles for the *Fusarium solani* species complex: comparison between the E-test and CLSI M38-A2 microdilution methodology. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012; 31(4):612-618.

LISTE DES ABREVIATIONS

°C : Degré Celsius

A : Adénine

A : Alanine

ABC : ATP binding cassette

ACC : AcetylCoA carboxylase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AFLP : Amplification fragment length polymorphism

ARN : Acide ribonucléique

ATCC : American type culture collection

ATMT : *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation

C : Cystéine

C : Cytosine

CBS-KNAW : Fungal Biodiversity Center

CDC : Centers for Disease Control

CiF : Cyber infrastructure for *Fusarium*

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentrations Minimales Inhibitrices

CYP : Cytochrome P450

D : Acide aspartique

dNTP : Désoxynucléotide triphosphate

E : Acide glutamique

EF1alpha : Translation elongation factor 1 alpha

EORTC : European organisation for research and treatment of cancer

ERIC-PCR : Enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR

F : Sens

FKS1 : Bêta 1,3 glucane synthase

FSSC : *Fusarium solani* Species Complex

G : Glycine

G : Guanine

GCPSR : Genealogical concordance of multilocus DNA sequence data

G-CSF : Granulocyte colony-stimulating factor

GM : Geometric mean

GM-CSF : Granulocyte macrophage colony-stimulating factor

GPD : Glyceraldehyde 3P deshydrogenase

H : Histidine

HE : Hématéine éosine

HLA : Human leukocyte antigen

I : Isoleucine

ICL : Isocitrate lyase

ITS : Intergenic spacer

J : Jours

K : Lysine

Kb : kilobases

L : Leucine

M : Méthionine

M : Molaire

MALDI-TOF : Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight

MAPK : Mitogen activated protein kinase

Mb : Mégabases

MFS : Major Facilitator Superfamily

MIC₉₀ : Minimum inhibitory concentration required to inhibit the growth of 90 % of organisms

MLST : MultiLocus Sequence Typing

MPD : Mannitol 1P deshydrogenase

MyD88 : Myeloid differentiation primary response 88

N : Asparagine

P : Proline

pacC : Facteur de transcription de la réponse au pH

PAS : Perodic acid Schiff

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PCR-RFLP : PCR - restriction fragment length polymorphism

PDA : Potato dextrose agar

Q : Glutamine

Qsp : Quantité suffisante pour

R : Anti-sens

R : Arginine

RAPD : Random Amplified Polymorphic DNA

Rep-PCR : Repetitive element palindromic PCR

RPB1 : Largest subunit of RNA polymerase

RPB2 : Second largest subunit of RNA polymerase

RPMI : Roswell Park Memorial Institute

S : Sérine

SOD : Superoxyde dismutase

T : Thréonine

T : Tyrosine

Taq : Thermophilus aquaticus

TEF : Facteur d'élongation

Th1 : T helper type 1

Th2 : T helper type 2

TLR : Toll like récepteurs

U : Unités

USER : Uracil specific excision reagent

UV : Ultraviolet

V : Valine

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

W : Tryptophane

X : Facteur de concentration

Y : Tyrosine

PARTIE I

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

LE COMPLEXE D'ESPECES

FUSARIUM SOLANI

ET LES FUSARIOSES HUMAINES

TAXINOMIE

La taxinomie ou taxonomie a pour objet de décrire les organismes vivants et de les regrouper en entités appelées taxons afin de les identifier, les nommer et enfin les classer. Depuis la seconde moitié du XX^{ème} siècle, une nouvelle approche conceptuelle de ces classifications est possible grâce à la biologie moléculaire.

La taxinomie en mycologie est donc en constante évolution suite aux données recueillies lors des différentes approches phylogénétiques. Ce remodelage des classifications s'applique également pour le genre *Fusarium*.

Le genre *Fusarium* appartient au phylum des *Ascomycota*, à la classe des *Ascomycètes* et à l'ordre des *Hypocreales*. Il s'agit d'un genre polyphylétique à la taxinomie complexe. Par exemple, *Fusarium solani* et *Fusarium verticillioides* possèdent des formes sexuées (téléomorphes) appartenant respectivement aux genres *Nectria* ou *Gibberella* alors que *Fusarium oxysporum* n'est actuellement connu que sous sa forme asexuée (anamorphe). La taxinomie du genre autrefois basée sur les aspects morphologiques ou l'adaptation à un substrat particulier, a été revue en profondeur avec l'avènement des techniques de phylogénie moléculaire. Les données récentes issues de ces travaux montrent que les anciennes taxinomies sont en partie erronées. Ceci s'est traduit par le rattachement d'espèces des genres *Acremonium* ou *Cylindrocarpon* au sein du genre *Fusarium* telles que *Acremonium falciforme* ou *Cylindrocarpon lichenicola* [Summerbell *et al.*, 2002](1) mais aussi par la notion de complexes d'espèces non différenciables morphologiquement (espèces cryptiques).

Au sein de ce complexe, notre intérêt se porte sur l'espèce *Fusarium solani* (nommée en 1881), qui est l'anamorphe de *Nectria haematococca* [de Hoog *et al.*, 2011](2).

La classification taxinomique complète, actuelle et corrigée de cette espèce (ou complexe d'espèces) est la suivante :

Tableau 1 : Classification taxinomique de *Fusarium solani*

Genre	<i>Nectria</i>
Famille	Nectriaceae
Ordre	<i>Hypocreales</i>
Sous classe	<i>Hypocreomycetidae</i>
Classe	<i>Sordariomycetes</i>
Division	<i>Ascomycota</i>
Règne	<i>Fungi</i>

Historiquement, l'appartenance au genre *Fusarium* et l'identification d'espèces était établie sur des similitudes morphologiques et physiologiques. Cependant ce mode de répartition des espèces est artificiel et manque de robustesse pour en déduire des fonctions biologiques, telles que la synthèse de mycotoxines spécifiques [Zhang *et al.*, 2006](3).

Depuis deux décennies, l'analyse multilocus de polymorphismes nucléotidiques de *Fusarium solani* et de son téléomorphe *Nectria haematococca* a montré que ces deux formes constituent un groupe de plus de 50 espèces distinctes tout en étant reliées génétiquement [Zhang *et al.*, 2006](3).

Ainsi une espèce décrite sur des aspects morphologiques telle que *Fusarium solani* regroupe plusieurs entités distinctes, appelées espèces biologiques qui peuvent être différenciées, notamment par le test de fertilité croisée. En effet, une inter-fertilité entre deux souches est possible uniquement si les deux isolats appartiennent à la même espèce biologique. En pratique, tous les membres d'une seule espèce biologique correspondent à une même espèce morphologique, mais plusieurs espèces biologiques peuvent être retrouvées dans une seule espèce morphologique [Leslie *et al.*, 2007](4).

Désormais, suite à ces études, la communauté scientifique reconnaît que *Fusarium solani* - *Nectria haematococca* est un complexe d'espèces, communément appelé FSSC *Fusarium solani* Species Complex [Zhang *et al.*, 2006](3).

Suite à l'analyse des polymorphismes de trois gènes d'intérêt (EF1 alpha, ITS et RPB2), les espèces phylogéniques appartenant à ce complexe sont distribuées entre trois clades [Zhang

et al., 2006](3). Cette répartition moléculaire est associée à des caractéristiques épidémiologiques. En effet, les membres des clades 1 et 2 sont isolés exclusivement de plantes (malades ou mortes), alors que les isolats du clade 3 sont des saprophytes environnementaux ou issus du sol. Notamment, toutes les souches humaines, animales ou retrouvées dans l'environnement hospitalier appartiennent à ce dernier clade 3. De plus, la répartition géographique des souches des clades 1 et 2 est limitée (respectivement Nouvelle Zélande et Amérique du Sud) alors que celle des isolats du clade 3 est cosmopolite. Ce dernier se distingue aussi par des caractères cultureux spécifiques tels qu'une vitesse de croissance plus importante et une plus grande capacité à produire des microconidies. Ces facteurs laissent supposer une plus grande agressivité des espèces du clade 3 ainsi qu'une facilité de pénétration et de dissémination chez l'hôte [Zhang *et al.*, 2006](3).

Actuellement, devant l'absence de dénomination latine pour chaque espèce phylogénétique du clade 3, la nomenclature utilisée (un nombre et une lettre) se base sur le profil obtenu lors de l'analyse phylogénétique, par exemple FSSC 1a [Chang *et al.*, 2006 ; Zhang *et al.*, 2006 ; O'Donnell *et al.*, 2008](5)(3)(6). Au sein du clade 3, la majorité des isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani* retrouvés en clinique humaine (75 %) sont repartis dans les groupes FSSC 1 à FSSC 4 [Zhang *et al.*, 2006](3). Lors de l'analyse phylogénétique, toutes les données sont regroupées sur des plateformes électroniques pour permettre à chacun d'utiliser cette nomenclature et d'enrichir les bases de données [Park *et al.*, 2011](7).

ÉCOLOGIE

Les champignons appartenant au genre *Fusarium* sp. sont très fréquemment retrouvés au niveau du sol, des végétaux, de l'air et de l'eau. Leur répartition géoclimatique est aussi très diversifiée puisque ces champignons filamenteux existent tant dans les régions tempérées que tropicales, mais aussi dans des zones climatiques extrêmes telles que les déserts, les montagnes et les régions polaires [Dignani *et al.*, 2004](8). Récemment, l'équipe de Palmero a montré la présence de plusieurs espèces de *Fusarium* (telles que *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *F. equiseti*, *F. dimerum* et *F. proliferatum*) dans la poussière atmosphérique et l'eau de pluie. Ces données expliquent la dispersion, parfois à longue distance, de ce pathogène par la pluie et le vent [Palmero *et al.*, 2011](9).

Le complexe d'espèces *Fusarium solani* est présent dans des environnements extrêmes, comme à l'intérieur du réacteur nucléaire endommagé de Tchernobyl, hautement radio-actif, ou dans des milieux en anaérobiose ou présentant une toxicité pour la plupart des autres champignons [Coleman *et al.*, 2009](10).

Les champignons du genre *Fusarium* sont des agents phytopathogènes de plus de 100 espèces végétales, pouvant ainsi détruire des récoltes entières de céréales [Nucci *et al.*, 2007](11). Certains de ces pathogènes peuvent également causer des infections chez les animaux ou les humains. Cette diversité d'hôtes a été démontrée par typage moléculaire pour le complexe d'espèces *Fusarium solani* [Zhang *et al.*, 2006](3).

Parallèlement aux pathologies humaines et végétales, le complexe d'espèces *Fusarium solani* est à l'origine de dommages environnementaux dans des grottes contenant des fresques paléolithiques. En effet, ce phénomène a été observé en Espagne à Castanar de Ibor en 2008 [Jurado *et al.*, 2010](12) et en France dans les grottes de Lascaux en 2001 [Dupont *et al.*, 2007 ; Bastian *et al.*, 2009 ; Bastian *et al.*, 2010](13)(14)(15). En Espagne, l'origine du développement du champignon sur les parois de la grotte est strictement humain (vomissement d'un visiteur) [Jurado *et al.*, 2010](12). En revanche, en France, la contamination fongique des grottes aurait une origine environnementale telle qu'une

percolation à partir des sols supérieurs ou se serait produite par l'intermédiaire d'arthropodes, des visiteurs ou des eaux de ruissellement [Dupont *et al.*, 2007](13).

Le complexe d'espèces *Fusarium solani* contamine également les piscines publiques, occasionnant parfois la fermeture de celles-ci, comme à Paris en 2010. En effet, les espèces du genre *Fusarium* peuvent être rencontrées sur les surfaces environnantes des bassins [Brandi *et al.*, 2007](16). Une étude parisienne dans une piscine servant à la rééducation fonctionnelle a montré la présence de ces champignons sur des surfaces entourant le bassin mais aussi comme agent d'onychomycoses chez des patients fréquentant ce centre de rééducation [Buot *et al.*, 2010](17). Le lien entre ces deux observations n'a pas été précisément établi bien que l'hypothèse de la contamination hydrique ait été avancée. Dans la même optique, un nombre important d'isolats recueillis en milieux hospitaliers ont été typés par biologie moléculaire. Cette étude a révélé que les 6 génotypes plus fréquemment isolés en clinique humaine correspondaient aux génotypes les plus retrouvés au niveau des éviers ou des immeubles. La relation causale n'a pas été documentée mais les études de génétique des populations des souches de *Fusarium* isolées chez l'Homme et dans l'eau semblent donner des résultats superposables [Short *et al.*, 2011](18).

Dans l'environnement hospitalier, le système de distribution de l'eau a été incriminé comme réservoir des espèces du genre *Fusarium* [Anaissie *et al.*, 2001 ; Kauffmann *et al.*, 2008 ; Mehl *et al.*, 2008 ; Sautour *et al.*, 2012](19)(20)(21)(22). Plus récemment, une étude a montré la présence de ces pathogènes dans l'eau utilisée pour les hémodialyses [Pires-Goncalves *et al.*, 2008](23). Ces deux observations posent la problématique du contrôle de la contamination fongique de l'eau mais aussi de la mise en œuvre d'une décontamination efficace sur ces espèces, comme l'a souligné une étude française multicentrique évaluant le risque fongique lié à l'eau [Kauffmann *et al.*, 2008](20).

MYCOLOGIE

Aspects morphologiques

Les champignons du genre *Fusarium* appartiennent aux hyalo-hyphomycètes et présentent un mycélium septé et incolore. En culture, les colonies présentent souvent des nuances roses, jaunes, rouges ou violettes. Les cellules conidiogènes se forment sur des hyphes aériens ou sur des conidiophores courts et densément branchés. Les conidies sont de trois types : macroconidies, microconidies et blastoconidies (figure 1).

Les macroconidies falciformes, avec plusieurs septa transverses, une extrémité apicale crochue et une base pédicellée sont produites en basipétale (croissance à partir de la base) par les monophialides ou les sporodochia (agrégats de conidiophores) et sont accumulées en masse.

Les microconidies sont ellipsoïdes, ovoïdes, subsphériques, pyriformes, claviformes ou allantoïdiennes, généralement unicellulaires et présentent une base arrondie ou tronquée. Elles sont produites en séries basipétales sur des mono ou polyphialides et accumulées en petites têtes ou en chaînes.

Les blastoconidies sont produites séparément sur des cellules polyblastiques et présentent de 0 à 3 septa.

Des chlamydospores, souvent présentes, sont hyalines ou pâles, intercalaires ou terminales et possèdent une paroi épaisse [de Hoog *et al.*, 2011](2).

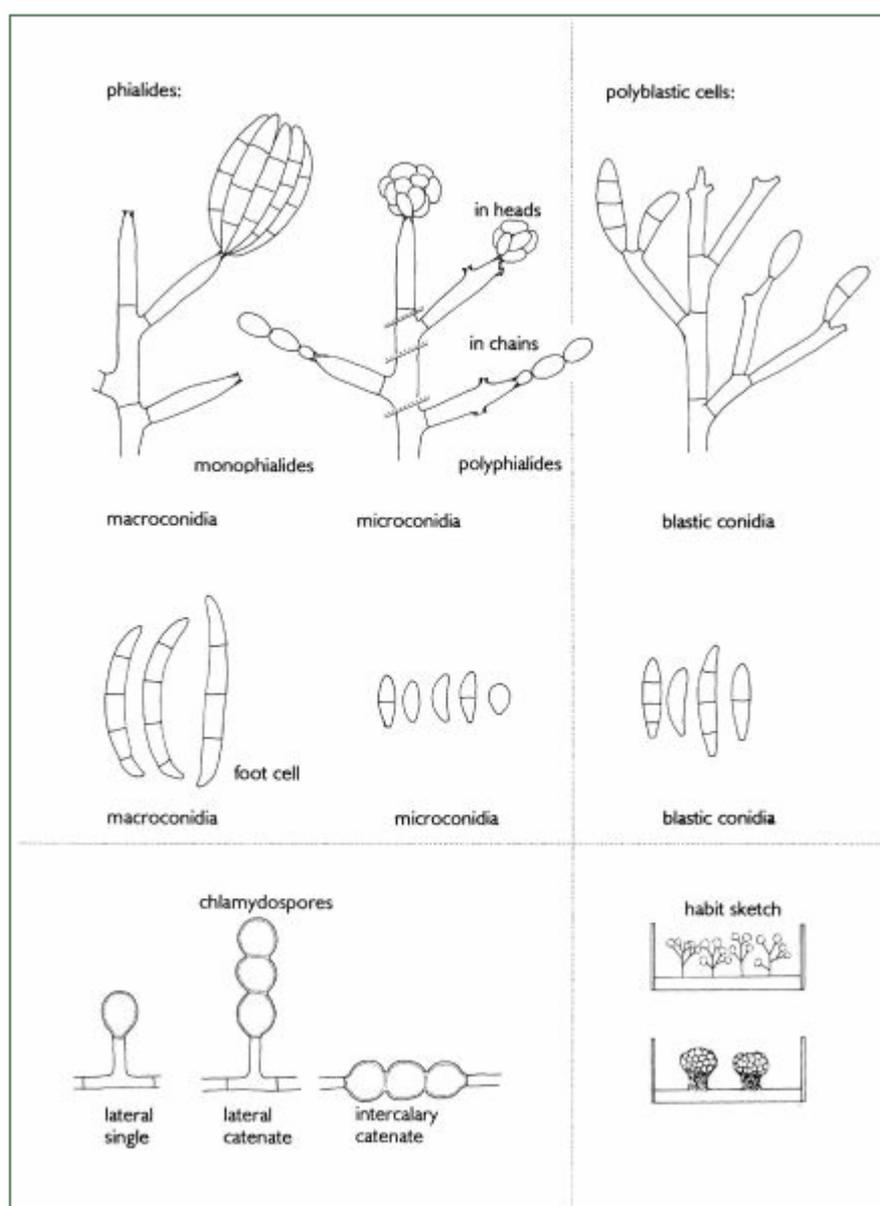


Figure 1 : Terminologie pour décrire la morphologie du genre *Fusarium*

Dans le cas du complexe d'espèces *Fusarium solani*, la culture sur Oatmeal agar pousse rapidement et présente un mycélium aérien de couleur blanche à crème et habituellement une teinte verte à brune lors de la présence de sporodochia. Le revers de la culture ne présente pas de couleur, mais une pigmentation de couleur « lie de vin » existe pour certaines souches (figure 3).

D'un point de vue microscopique (figure 2), le complexe d'espèces *Fusarium solani* présente des conidiophores émergents perpendiculairement des filaments aériens, de type monophialides avec une collerette distincte (figure 5). Les macroconidies sont produites sur des conidiophores courts et branchés et sont généralement peu incurvées, avec une base apicale courte et émoussée et sans cellule basale distinguable (figure 4). La plupart d'entre elles présentent 3 septa, ou occasionnellement 5, et mesurent 28 - 42 x 4 - 6 μm . Les microconidies, habituellement abondantes, sont produites sur des conidiophores allongés et verticillés et mesurent 8 - 16 x 2,0 - 4,5 μm (figure 6). Les chlamydospores sont fréquentes, uniques ou en paires, terminales ou intercalaires, lisses ou rugueuses et mesurent de 6 à 10 μm de diamètre (figure 7) [de Hoog *et al.*, 2011](2).

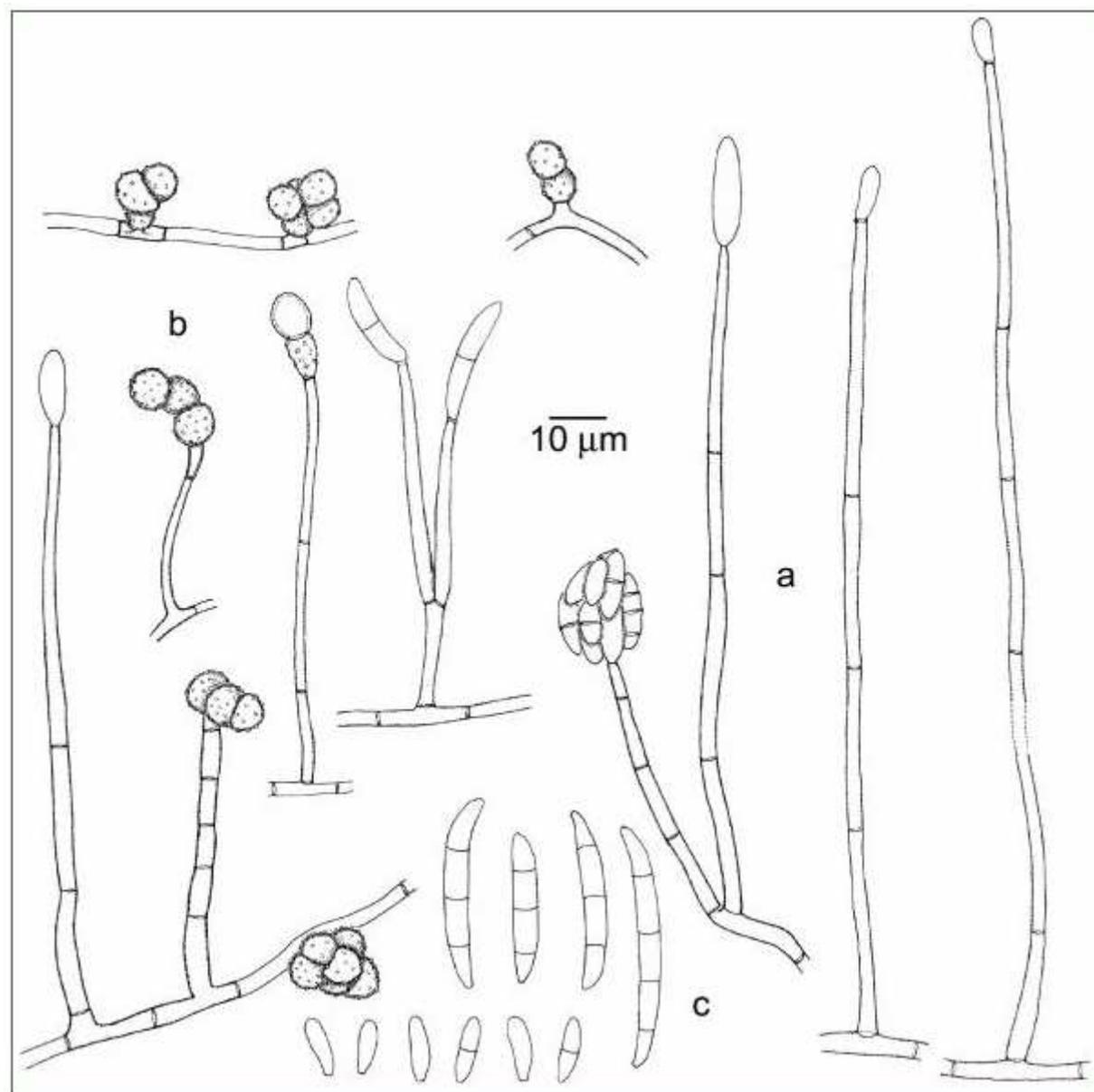


Figure 2 : Structure microscopique de *Fusarium solani* CBS 490.63

(a : conidiophores avec monophialides ; b : chlamydospores ; c: micro et macroconidies)

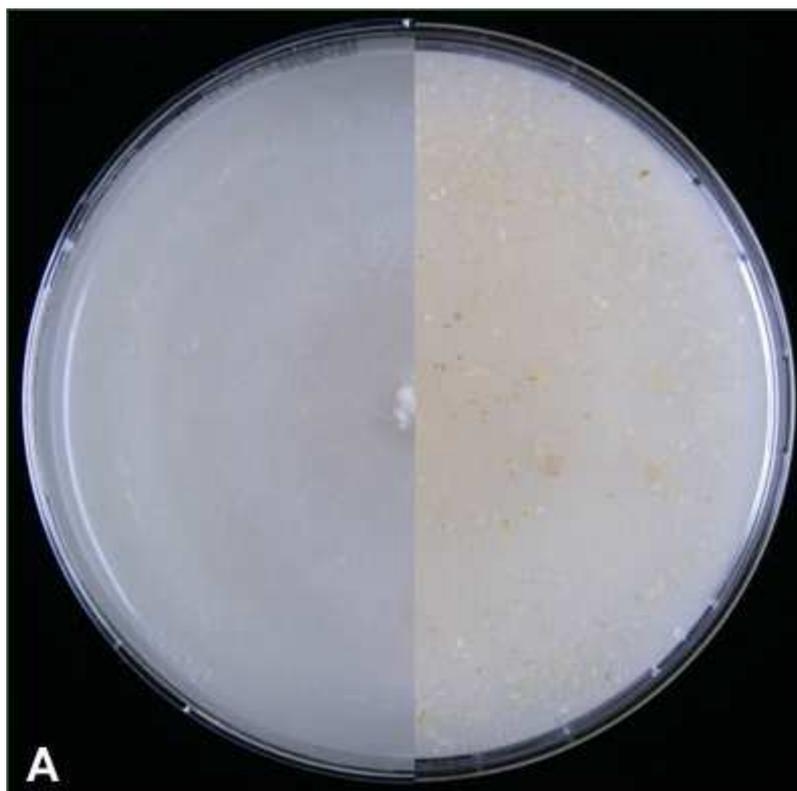


Figure 3 : Aspect macroscopique de *Fusarium solani* CBS 224.34

(endroit : gauche ; revers : droit ; après 10 jours de culture sur milieu Oatmeal agar à 24°C)

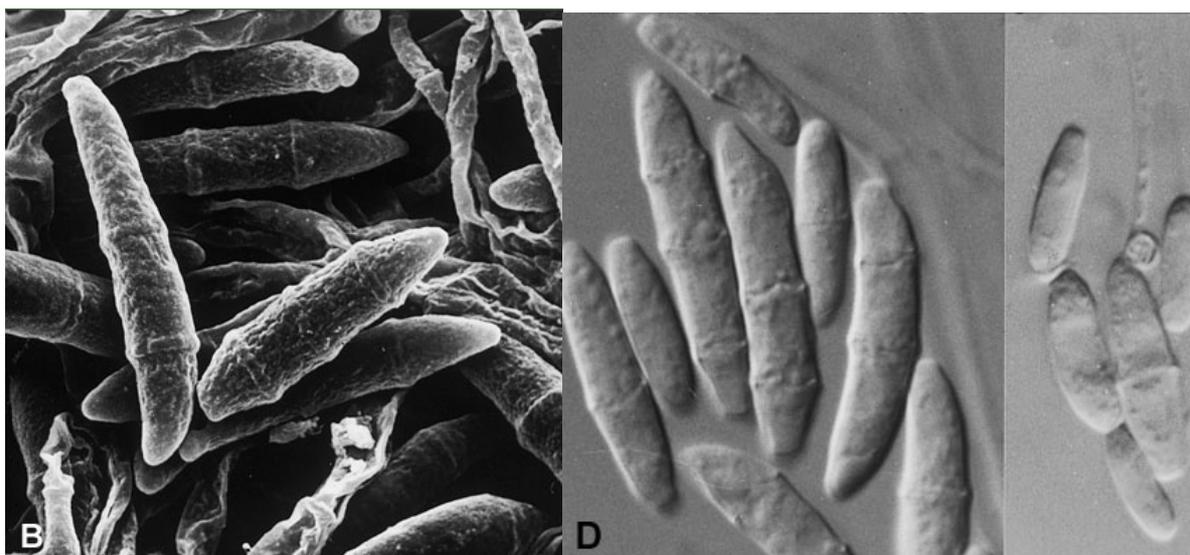


Figure 4 : Macroconidies

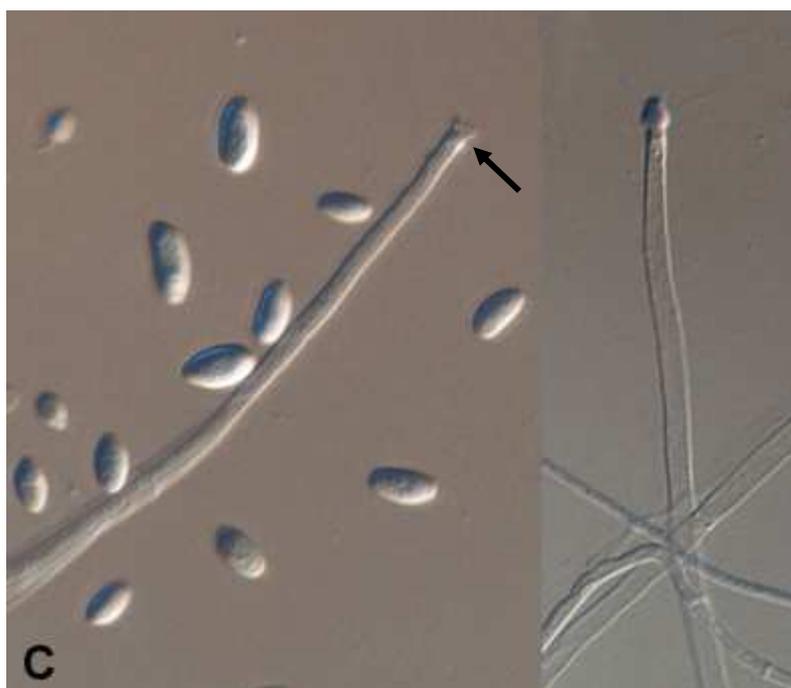


Figure 5 : Monophialides

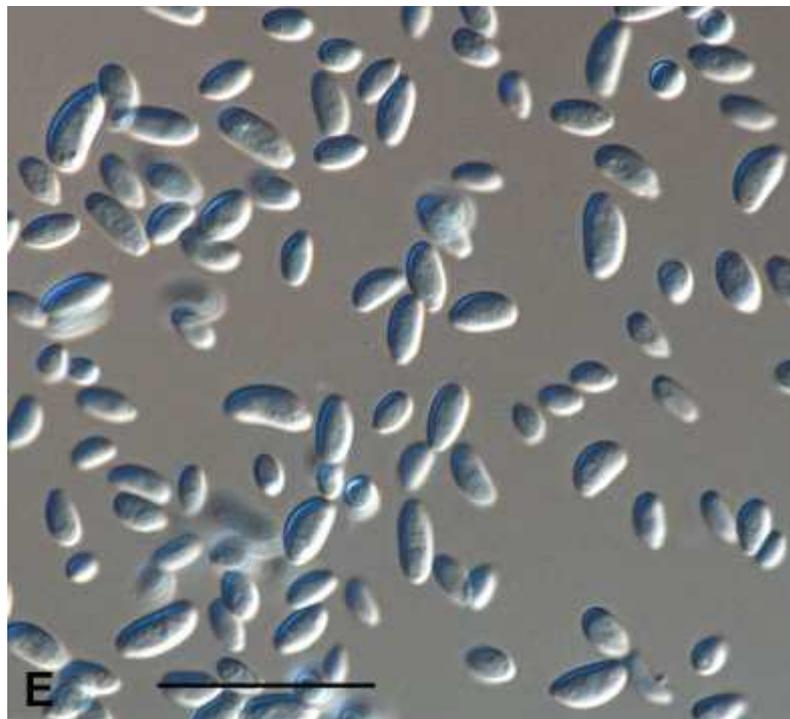


Figure 6 : Microconidies



Figure 7 : Chlamydospores

Métabolites secondaires

Au cours des dernières décennies, il a été démontré que les champignons fréquemment retrouvés dans l'alimentation pouvaient produire des toxines, appelées mycotoxines. Historiquement, ces toxines ont provoqué des épidémies majeures tant chez l'Homme que chez l'animal tel que l'ergotisme. Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, c'est-à-dire qu'elles ne jouent aucun rôle dans la croissance du champignon. Ces molécules n'induisent pas de réponse du système immunitaire et peuvent présenter quatre types de toxicité : aigüe, chronique, mutagène et tératogène. Les cinq mycotoxines les plus importantes sont les aflatoxines, l'ochratoxine A, les fumonisines, les trichothécènes et la zéaralénone [Pitt 2000](24). Les deux premières ne sont pas produites par les champignons du genre *Fusarium* contrairement aux trois dernières synthétisées en quantités variables en fonction des espèces. Les principales espèces de *Fusarium* sp. productrices de mycotoxines sont *Fusarium moniliforme* pour les fumonisines et *Fusarium graminearum* pour les trichothécènes et la zéaralénone [Pitt 2000](24). Les mycotoxines produites par le complexe d'espèces *Fusarium solani* le sont en faible quantité. Parmi celles-ci, l'acide fusarique a été détecté dans des isolats cliniques issus de kératites [Naiker *et al.*, 2004](25) ou phytopathogènes [Moretti *et al.* 2010](26). Des traces de deoxynivalénol (composé de la famille de trichothécènes) ont également été retrouvées dans des cultures de ce champignon sur milieu à l'extrait de Malt [Richard *et al.*, 2007](27).

La synthèse de métabolites secondaires tels que les mycotoxines présente un impact négatif sur l'agriculture ou la santé. Cependant certaines de ces substances peuvent être utilisées dans l'industrie pharmaceutique comme principe actif. Dans le cas du complexe d'espèces *Fusarium solani*, deux molécules : la camptothécine et la 10-hydroxycamptothécine ont été récemment identifiées dans le mycélium lors de l'endoparasitisme d'un arbuste indien (*Apodytes dimidiata*). Ces composés sont d'importants précurseurs de la synthèse de molécules utilisées comme anticancéreux en clinique tels que l'irinotecan et le topotecan [Shweta *et al.*, 2010](28).

Caractères moléculaires

Au sein du genre *Fusarium*, le génome complet de 4 espèces a été complètement séquencé : *Fusarium graminearum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum* [Al-Reedy *et al.*, 2012] (29).

Concernant le génome de *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*), celui-ci a été obtenu en 2007 par the Joint Genome Institute et l'ensemble de ces données sont mises à disposition sur le site Web <http://genome.jgi-psf.org/Necha2/Necha2.home.html> [Coleman *et al.*, 2009 ; Rep *et al.*, 2010] (10)(30).

La souche utilisée lors du séquençage présente 17 chromosomes avec des tailles variables allant de 530 kb à 6,52 Mb. La taille totale de ce génome est de 54,43 Mb et le nombre de gènes prédits est de 15 707. Ceci constitue donc l'un des génomes les plus importants, en taille, parmi les Ascomycètes.

Deux catégories de gènes permettent d'expliquer la taille très conséquente de ce génome : d'une part, les gènes spécifiques de *Fusarium solani* et qui ne sont pas retrouvés dans les autres espèces fongiques (même celles génétiquement proches telles que *Fusarium graminearum*) et d'autre part, les gènes habituellement présents en une seule copie chez les autres champignons mais retrouvés en copies multiples chez *Fusarium solani*. Certains de ces gènes additionnels résulteraient d'une duplication, alors que d'autres auraient été acquis par transfert horizontal [Coleman *et al.*, 2009](10).

Les chromosomes 14, 15 et 17 sont surnuméraires et donc absents de certains isolats. Ils se différencient des autres car ils contiennent plus de séquences répétées, sont particulièrement riches en gènes uniques ou dupliqués et présentent une faible proportion de GC. Leur origine n'est pas connue mais leur taille génomique importante pourrait expliquer la diversité d'habitats de cette espèce. En effet, les gènes uniques de ces chromosomes surnuméraires coderaient des fonctions biochimiques en rapport avec les phénomènes d'adaptation des souches à des niches écologiques différentes. Ces éléments semblent être l'équivalent des

plasmides chez les bactéries et ils contribuent à la diversité microbienne et à l'évolution des champignons [Coleman et al., 2009](10).

PHYSIOPATHOLOGIE

Pouvoir pathogène

Les mycotoxines synthétisées par les espèces du genre *Fusarium* leur confèrent un pouvoir pathogène important vis-à-vis des végétaux ou des mammifères dont l'Homme [Nucci *et al.*, 2007](11). Les mycotoxicoses sont ainsi dues à l'ingestion d'aliments contaminés par les mycotoxines. La plus connue est l'aleukie alimentaire toxique secondaire à la consommation de céréales colonisées par *Fusarium sporotrichioides* et *Fusarium poae*. Les manifestations initiales sont gastro-intestinales mais secondairement apparaissent des symptômes cutanés et hématologiques avec immunosuppression. Les autres mycotoxicoses se manifestent sous forme d'ostéo-arthrose dystrophique chronique ou de symptômes gastro-intestinaux et neurologiques [Gupta 2000](31).

Ces champignons présentent également la capacité de produire du biofilm en présence de matériaux étrangers tels que les lentilles oculaires ou les cathéters. Le micro-organisme, ainsi intégré dans une matrice extracellulaire endogène, devient plus résistant aux différents traitements antifongiques ou aux solutions de nettoyage du matériel [Ahearn *et al.*, 2008 ; Dyavaiah *et al.*, 2007 ; Imamura *et al.*, 2008 ; Mukherjee *et al.*, 2012](32)(33)(34)(35).

Peu d'études de virulence ont été réalisées sur le genre *Fusarium*. Cependant, parmi les espèces les plus courantes, celles du complexe d'espèces *Fusarium solani* semblent être les plus virulentes. En effet, dans un modèle murin de fusariose chez l'animal immunocompétent, la médiane de survie était à 14 jours pour *Fusarium solani* alors que pour les autres espèces (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium verticilloïdes* et *Fusarium proliferatum*), une grande majorité d'animaux était encore en vie à la fin de la période d'observation de 30 jours [Mayayo *et al.*, 1999](36).

Des modèles de kératites ont été développés *in vivo* chez l'animal, comme chez le rat avec des lentilles en paraffine [Zhu *et al.*, 2011](37) mais également *in vitro* en étudiant les interactions entre le champignon et les lentilles de contact. *Fusarium solani* est capable de s'attacher à la surface des lentilles de contact, et de manière suffisamment forte pour que le simple rinçage passif avec les solutions de nettoyage ne permette pas de l'en détacher [Ahearn *et al.*, 2007](38). De plus, cette capacité est espèce et génotype dépendante, les souches de *Fusarium solani* du groupe 1 ont une pénétration plus rapide et plus extensive que celles du groupe 2 ou 3 ou que les souches du complexe d'espèces *Fusarium oxysporum* [Ahearn *et al.*, 2009](39). Le mode de croissance des champignons dans la cornée est également différent en fonction des genres fongiques. *Fusarium* présente un mode de croissance parallèle à la cornée, qui semble être moins associé à des récurrences cliniques [Xie *et al.*, 2008](40).

Le complexe d'espèces *Fusarium oxysporum* a été utilisé comme modèle afin d'étudier des mécanismes de virulence à la fois chez les plantes et les mammifères. Différents mutants dont les gènes sont connus pour être impliqués dans la virulence du champignon sur les plants de tomates (modèle végétal) ont été inoculés dans le modèle murin. Il a alors été observé que ces facteurs de virulence jouent des rôles distincts au cours de l'infection fongique en fonction du type d'hôte considéré [Ortoneda *et al.*, 2004 ; Prados Rosales *et al.*, 2006](41)(42). Par exemple, le gène codant pour la protéine kinase MAPK (mitogen activated protein kinase), qui est essentiel pour la virulence vis-à-vis des plantes, n'est pas nécessaire dans les infections animales. En revanche, le facteur de transcription de la réponse au pH (*pacC*) est requis pour une virulence chez l'animal mais pas chez les plantes.

Aspects immunitaires

Bien que peu d'études soient disponibles sur les mécanismes de défense mis en œuvre contre les champignons du genre *Fusarium*, les fusarioses invasives présentent des similitudes avec les autres mycoses invasives telles que l'aspergillose invasive et notamment sa prédominance chez les sujets immunodéprimés (patients présentant une hémopathie maligne ou allogreffés) [Nucci *et al.*, 2007](11). En effet, seuls les patients immunodéprimés présentent des fusarioses invasives ou disséminées [Lortholary *et al.*, 2010](43). De plus, une neutropénie prolongée et une corticothérapie à forte dose ont été définies comme marqueurs de mauvais pronostic [Nucci *et al.*, 2003](44).

Historiquement, Legrand et collaborateurs ont été les premiers à développer un modèle murin de fusariose. Une corrélation entre l'inoculum et la mortalité a ainsi été démontrée. Ce modèle a surtout permis de décrire histologiquement le type de réponse cellulaire associé à cette infection en fonction de l'immunité de l'hôte. Chez les souris immunocompétentes, des abcès nécrotiques présentant des filaments septés, une infiltration de neutrophiles et de macrophages et des zones d'hémorragies sont observés. En revanche, chez la souris neutropénique, aucune réaction inflammatoire n'est mise en évidence mais la charge fongique est plus importante et l'infection est disséminée à la plupart des organes [Legrand *et al.*, 1991](45).

La réponse immunitaire de type innée joue un rôle majeur dans la défense contre les infections fongiques à moisissures [Shoham *et al.*, 2005](46). Les polynucléaires neutrophiles et les macrophages endommagent les filaments de *Fusarium*. Cette activité de phagocytose est majorée *in vitro* par la présence d'interféron gamma, de G-CSF (granulocyte colony-stimulating factor) ou de GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) [Gaviria *et al.*, 1999](47). D'une manière analogue, l'interleukine 15 induit au niveau des polynucléaires neutrophiles une destruction des filaments sans intervention du système oxydatif et elle permet également une libération d'interleukine 8, qui agit par voie autocrine [Winn *et al.*, 2005](48). Plus récemment, le rôle des Toll like récepteurs (TLR) a été démontré dans la reconnaissance du champignon par l'immunité innée [Romani 2004](49). De manière plus spécifique, cette voie a été explorée dans des modèles murins de kératites à *Fusarium*

solani. D'une part, il a été montré que la sévérité des lésions et la clairance d'élimination du champignon était dépendante de l'immunité du sujet (modèle lapin traité par cyclophosphamide) [Wu *et al.*, 2004](50). D'autre part, le rôle des macrophages a été souligné dans cette forme clinique de fusariose et une déplétion de ceux-ci entraîne une dysrégulation de la réponse antifongique par modification de la balance Th1/Th2 [Hu *et al.*, 2009](51). Au niveau moléculaire, l'activité antifongique induite par les neutrophiles dépend du TLR4 et non du TLR2. De plus, au niveau de la voie de signalisation des TLR, un rôle essentiel du récepteur à l'interleukine 1 et de MyD88 a été montré dans l'immunité anti-*Fusarium*. En effet, une déplétion en l'un ou l'autre de ces éléments conduit à une croissance fongique incontrôlée et à une perforation de la cornée [Tarabishy *et al.*, 2008 ; Sun *et al.*, 2010](52)(53). Dans les kératites, les cellules épithéliales de cornées constituent un autre type cellulaire impliqué dans la réaction immunitaire vis-à-vis de filaments de *Fusarium solani* par l'intermédiaire des TLR2 et TLR4 [Jin *et al.*, 2007](54).

CLINIQUE

Colonisation

Peu de données existent à l'heure actuelle sur la colonisation des espèces appartenant au genre *Fusarium*. Cependant, les avancées technologiques telles que le séquençage haut débit permettent désormais d'étudier les flores et les « mycobiomes ».

Chez l'Homme, le microbiome fongique de la cavité orale a été caractérisé par pyroséquençage chez 20 individus sains. Le genre *Fusarium* est rapporté chez 30 % des participants [Ghannoum *et al.*, 2010] (55). La description de la flore intestinale de modèles murins a permis d'étudier le mycobiome dans lequel le genre *Fusarium* était également représenté [Scupham *et al.*, 2006] (56).

Ces données préliminaires restent à explorer plus en détails pour étayer l'hypothèse d'une contamination endogène lors des fusarioses.

Infections superficielles

ONYCHOMYCOSES

Les onychomycoses représentent 30 % des mycoses superficielles et 50 % des pathologies unguéales. Les moisissures sont responsables de 2 à 12 % des onychomycoses, en fonction de la population et des zones géographiques étudiées. Les principaux genres en cause sont *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Scytalidium* [Moreno *et al.*, 2010] (57).

La proportion d'onychomycoses à *Fusarium* et *Fusarium solani* a été étudiée dans plusieurs études. Ainsi, en considérant les onychomycoses dans leur ensemble (dermatophytes compris), le genre *Fusarium* est responsable de 8 cas pour 547 patients dont 4 cas à *Fusarium oxysporum* et 4 à *Fusarium solani* dans une étude brésilienne [Godoy *et al.*, 2004] (58). Une prévalence de 3 % est rapportée en Suisse pour le genre *Fusarium* [Ninet *et al.*, 2005] (59). Moreno rapporte dans sa revue les données d'une étude colombienne où *Fusarium* est l'agent responsable de 50 % des 310 onychomycoses non dues aux dermatophytes. Dans cette région, la répartition des espèces de *Fusarium* est la suivante : *Fusarium solani* (64,9 %), *Fusarium oxysporum* (32,8 %) et *Fusarium verticillioides* (2,3 %) [Castro Lopez *et al.*, 2008](60). Cependant, concernant la proportion du genre *Fusarium* dans ces onychopathies, d'autres données fournissent des proportions très variées : 44 % en Italie [Tosti *et al.*, 2000](61), 32 % au Japon (*Fusarium solani* : 5/25 ; *Fusarium verticillioides* : 2/25 et *Fusarium oxysporum* : 1/25) [Ebihara *et al.*, 2009](62), moins de 2 % au Mexique [Moreno *et al.*, 2010](57) ou en Corée [Hwang *et al.*, 2012](63).

Ces prévalences diffèrent selon la région géographique étudiée, le mode de culture et d'identification du champignon responsable de l'onychomycose mais aussi d'après la population étudiée. En effet, un contact étroit avec le sol (terre), l'habitude de marcher pieds nus ou en sandales, la fréquentation des piscines ou les traumatismes des pieds sont des

facteurs prédisposant au développement des onychomycoses ou des intertrigos à *Fusarium* [Godoy *et al.*, 2004](58).

Ces facteurs de risques reposent sur le fait que *Fusarium* est un champignon saprophyte retrouvé dans la nature et phytopathogène. De plus, comme les autres moisissures, il ne présente pas d'activité kératolytique à la différence des dermatophytes. Ces micro-organismes ne vivent donc que dans le ciment intercellulaire non kératinisé ou profitent de la destruction de la kératine par les dermatophytes, des traumatismes ou des pathologies unguéales [Hwang *et al.*, 2012](63). Ces éléments de physiopathologie expliquent d'ailleurs la plus faible incidence des moisissures par rapport aux dermatophytes dans les onychomycoses.

Les onychomycoses à *Fusarium* peuvent être de différents types : sous-unguéales latéro-distales (figure 8 C), blanches superficielles (figure 8 B) ou sous-unguéales proximales (figure 8 A). Dans cette dernière forme, des leuconychies et/ou une inflammation péri-unguéale peut être associée [Gupta *et al.*, 2000](31).

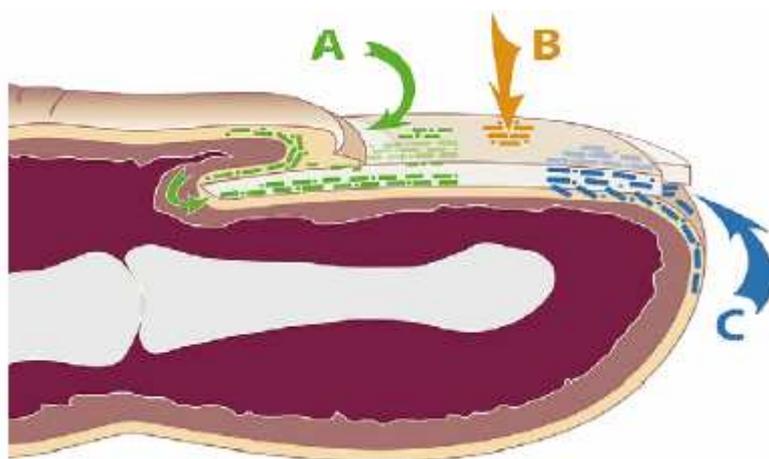


Figure 8 : Différentes voies d'infection de l'ongle [Baran *et al.*, 2007](64)

Dans une étude clinique italienne sur les onychomycoses à moisissures, les ongles des pieds étaient plus fréquemment atteints que ceux des mains (pieds : 21 / mains : 5). L'atteinte, la plus représentée (21 patients) est proximale et associée à une inflammation péri-unguéale

douloureuse. L'ongle infecté prend une teinte jaunâtre – blanchâtre et présente souvent une surface opaque. Le contour proximal et la cuticule apparaissent jaune – blanc (figure 9). Dans de rares cas (5), une atteinte distale est observée avec une décoloration blanche de l'ongle (figure 10) [Tosti *et al.*, 2000](61).



Figure 9 : Atteinte proximale de l'ongle [Tosti *et al.*, 2000](61)



Figure 10 : Atteinte distale de l'ongle [Tosti *et al.*, 2000](61)

Des formes cliniques atypiques telles qu'une mélanonychie (figure 11) peuvent être décrites lors d'une onychomycose à *Fusarium solani*, l'ongle prend alors une coloration noire [Lee *et al.*, 2002](65).



Figure 11 : Mélanonychie à *Fusarium solani* [Lee *et al.*, 2002](65)

Des cas de co-infections *Fusarium solani* – *Pseudomonas aeruginosa* sont également décrits. Les ongles présentent alors un épaissement et une couleur vert – jaune. La documentation

mycologique de ces cas est parfois difficile du fait de la croissance rapide et extensive de la bactérie qui peut empêcher la croissance du champignon [Yang *et al.*, 2009](66).

Une fois qu'une pathologie unguéale est observée et que le diagnostic d'onychomycose est suspecté, un prélèvement mycologique s'impose. Cependant, comme les espèces du genre *Fusarium* sont des agents saprophytes et ubiquitaires dans l'environnement, le champignon isolé dans les milieux de culture est-il toujours responsable de la forme clinique ? ou doit-il être considéré comme contaminant ?

De ce fait, Summerbell a classé les moisissures isolées lors d'onychomycoses selon différentes catégories : contaminant ; flore commensale normale ; colonisateur saprophyte transitoire ; colonisateur secondaire persistant ; envahisseur successif à un autre pathogène et envahisseur primaire [Summerbell 1997 ; Ebihara *et al.*, 2009](67)(62). Cependant, associer une espèce à l'une de ces catégories en fonction de la situation clinique n'est pas aisé et les critères diagnostiques d'une onychomycose restent à ce jour ceux proposés en 1976 [Moreno *et al.*, 2010](57) :

- Lorsqu'un dermatophyte est isolé, il est toujours considéré comme l'agent causal de cette onychomycose.
- Le diagnostic d'une onychomycose à moisissure ou levure est validé lorsque des éléments compatibles tels que mycélium, arthrospores ou levures ont été observés au niveau de l'examen direct d'un fragment d'ongle.
- Pour diagnostiquer une infection à moisissure, le champignon doit être isolé sur un milieu contenant de l'actidione ou non sur au moins 5 inocula parmi 20.

Le diagnostic et le traitement d'une onychomycose à *Fusarium* est indispensable dans la mesure où cette infection peut constituer la porte d'entrée d'une infection disséminée, se révélant rapidement létale [Wu *et al.*, 2009](68). Devant la fréquence non négligeable de ces infections unguéales, une attention particulière doit être portée sur les anomalies des ongles et notamment avant de débiter un traitement immunosuppresseur [Ninet *et al.*, 2005](59).

MYCETOMES

Un eumycétome est une infection fongique chronique caractérisée par des fistules, des grains et une tuméfaction touchant une partie du corps (plus généralement les pieds). Le tissu osseux peut également être touché [Tomimora *et al.*, 2003](69).

Parmi les champignons identifiés comme agents de cette pathologie, *Fusarium solani* fait partie des espèces exceptionnellement en cause [Katkar *et al.*, 2011](70). Cette donnée est confortée par une étude brésilienne, qui a incriminé *Fusarium solani* dans 2 cas parmi 76 eumycétomes [Negroni *et al.*, 2006](71). Sporadiquement, des cas cliniques sont rapportés dans la littérature à ce sujet à cause de leurs localisations atypiques (fesses) [Katkar *et al.*, 2011](70) ou du délai important entre la contamination probable et le diagnostic [Yera *et al.*, 2003](72).

KERATITES

Les kératites fongiques se caractérisent par une ulcération de la cornée et une suppuration [He *et al.*, 2011](73). Cliniquement, elles se manifestent par une sensation de corps étrangers, une douleur de l'œil et une rougeur, associées ou non à une diminution de l'acuité visuelle. Ces signes sont ceux de toutes kératites infectieuses. Cependant, certaines manifestations font évoquer une étiologie fongique : les marges de l'infiltrat en plumes, des lésions satellites, des infiltrats en anneaux, des plaques endothéliales ou un hypopyon [Alfonso 2008](74). Ces infections sont insidieuses, rapidement progressives et de diagnostic difficile. De plus, elles sont fréquemment réfractaires à la thérapeutique et peuvent ainsi évoluer vers l'endophtalmie et conduire à la cécité du patient ou à la perte de l'œil infecté [Wykoff *et al.*, 2008 ; Dursun *et al.*, 2003 ; Edelstein *et al.*, 2011](75)(76)(77).

Différents terrains peuvent favoriser ces kératites : une baisse de l'immunité de l'hôte, un usage inapproprié des collyres antibiotiques ou à base de corticoïdes, une blessure préalable de la cornée, le port de lentilles de contact et la chirurgie ou la greffe oculaire [He *et al.*, 2011](73).

La kératite fongique est une pathologie cosmopolite. Elle est particulièrement fréquente dans les pays en voie de développement des régions tropicales et subtropicales où elle représente 50 % des étiologies d'infections de la cornée, alors qu'elle est très rare dans les pays développés des régions tempérées [He *et al.*, 2011](73).

Actuellement, plus de 56 genres et 105 espèces fongiques sont responsables de kératites fongiques. Cependant, l'espèce pathogène responsable de ces infections diffère selon les pays ou les régions, en raison du climat, de l'environnement et des autres facteurs naturels. En dehors des descriptions de cas groupés, peu de données sont disponibles dans la littérature sur l'épidémiologie des kératites fongiques. Par exemple, en Inde, les champignons principalement responsables de ces pathologies oculaires sont *Aspergillus* sp. et *Curvularia* sp.. Au Brésil ou en Chine, il s'agit plutôt du genre *Fusarium*, suivi de *Candida* et *Aspergillus*. Enfin au Royaume Uni, 50 % des infections de la cornée sont dues au genre *Candida* [He *et al.*, 2011](73).

De ce fait, les kératites à *Fusarium* sp. représentent 48.2 % des kératites fongiques en Chine, dont 35.2 % à *Fusarium solani* [He *et al.*, 2011](73). En Inde, cette dernière espèce est retrouvée dans 25 % des prélèvements de cornée [Nath *et al.*, 2011](78).

Devant l'absence de spécificité clinique d'une kératite fongique par rapport aux autres étiologies infectieuses, le diagnostic de certitude repose sur le grattage cornéen avec examen direct et mise en culture (figure 12 et 13). Cependant, aujourd'hui, un diagnostic précoce est possible grâce à une méthode non invasive : la microscopie confocale *in vivo*, qui permet de visualiser les éléments fongiques directement sur la cornée (figure 14) [Brasnu *et al.*, 2007](79).



Figure 12 : Observation à la lampe à fente d'une kératite à *Fusarium solani* [Brasnu *et al.*, 2007](79)

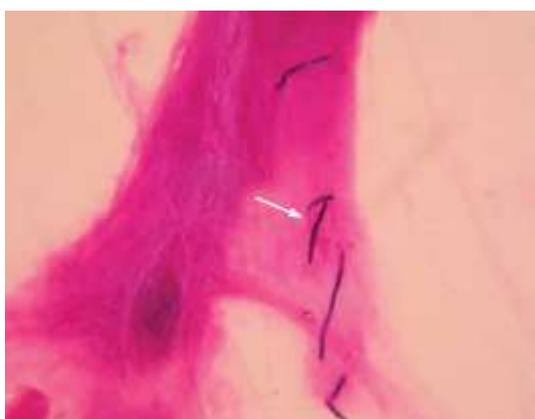


Figure 13 : Examen direct (coloration de Gram) d'une kératite à *Fusarium solani* (les filaments mycéliens sont représentés par la flèche blanche) [Brasnu *et al.*, 2007](79)

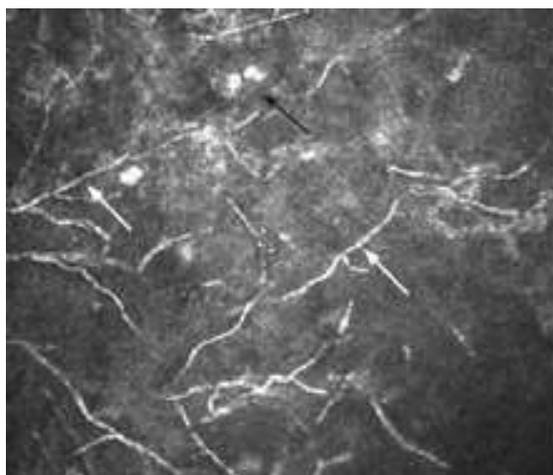


Figure 14 : Observation en microscopie confocale *in vivo* d'une kératite à *Fusarium solani* (les filaments mycéliens sont représentés par les flèches blanches et les cellules inflammatoires par la flèche noire) [Brasnu *et al.*, 2007](79)

Les données épidémiologiques précédentes sont à considérer en dehors de tout contexte épidémique. En effet, 9 cas groupés d'endophtalmies à *Fusarium solani* ont été rapportés dans un même bloc opératoire en Turquie lors de chirurgies dans des contextes de cataracte. La source environnementale n'a pas été découverte mais l'hypothèse d'une contamination de la solution d'antibiotiques utilisée est la plus vraisemblable [Güngel *et al.*, 2011](80). Cette situation est extrêmement rare mais une épidémie mondiale sans précédent de kératites à *Fusarium* touchant majoritairement les continents asiatiques et américains entre 2005 et 2006 retiendra notre attention.

Les premiers cas de kératites à *Fusarium* sp. émanent de Hong Kong et Singapour. Le 08 mars 2006, le CDC (Centers for Disease Control – Etats-Unis) reçoit un rapport du Docteur David S. Chu (ophtalmologiste dans le New Jersey) qui décrit trois cas de kératites à *Fusarium* sp. chez des porteurs de lentilles de contact [Epstein 2007](81).

A Hong Kong de mai 2005 à avril 2006, 33 cas ont été décrits entraînant la mise en place d'une étude cas – témoin chez les porteurs de lentilles. Le principal facteur de risque mis en évidence est l'utilisation de la solution d'entretien des lentilles de contact Bausch & Lomb ReNu® avec un odds ratio de 16.56 [Ma *et al.*, 2009](82). Sur la même période, l'épidémie a été plus conséquente à Singapour avec 66 patients touchés [Khor *et al.*, 2006](83) et là également la même marque de solution de nettoyage a été suspectée avec 99.3 d'odds ratio

pour la formulation « ReNu with MoistureLoc » et 21.5 pour « ReNu MultiPlus » [Saw *et al.*, 2007](84).

Au Etats Unis, la situation épidémique est mise en évidence suite au rapport du Dr Chu puis une première description de cas groupés est publiée à San Francisco avec 4 cas de kératites à *Fusarium* survenus en moins de 5 semaines à compter de fin février 2006 [Bernal *et al.*, 2006](85). Au printemps 2006, le CDC réalise une étude multicentrique sur les cas épidémiques avec recherche des facteurs de risque. A la fin juin 2006, 164 cas confirmés sont décrits, répartis sur 33 états et un territoire américain. L'étude cas - témoin associée montre que l'utilisation de la solution pour lentilles de contact « ReNu with MoistureLoc » est considérée comme un facteur de risque majeur (odds ratio de 13.3) [Chang *et al.*, 2006](5).

D'autres zones géographiques ont également été confrontées à cette épidémie : la Martinique avec 14 abcès de cornée en 6 mois [Donnio *et al.*, 2007](86), la France avec 17 cas [Gaujoux *et al.*, 2008](87) et la Suisse avec 6 [Kaufmann *et al.*, 2008](88).

L'épidémie de kératites à *Fusarium* survenue en 2005 – 2006 chez des porteurs de lentilles souples de contact est donc à la fois soudaine et sans précédent. Au final 483 cas ont été rapportés dans le monde entier, principalement associés aux solutions Bausch & Lomb « ReNu with MoistureLoc » et, plus récemment Bausch & Lomb « ReNu MultiPlus » [Epstein 2007] [Bullock 2009](81)(89). Ceci a d'ailleurs conduit à l'arrêt de la commercialisation de ces deux produits.

Une étude multicentrique rétrospective entre 2001 et 2007 sur les kératites fongiques a montré que cette augmentation nette mais transitoire de l'isolement de *Fusarium* sp. dans les prélèvements de cornée était un phénomène épidémique (figure 15) [Gower *et al.*, 2010](90). De plus, une analyse statistique du nombre de cas a démontré grâce à la loi de Poisson que la notion d'épidémie peut être utilisée dans ce contexte dès le 3^{ème} cas [Bullock 2008 ; Bullock 2009](89)(91).

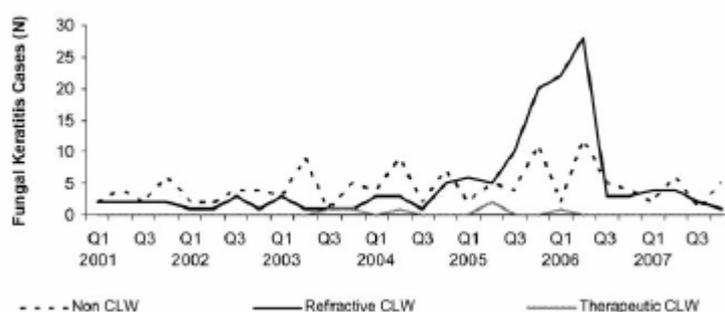


Figure 15 : Distribution des cultures positives à *Fusarium* [Gower *et al.*, 2010](90)

Secondairement aux études cas – témoins incriminant les solutions de nettoyage des lentilles de contact, différentes étiologies ont été suggérées [Epstein 2007](81) pour déterminer les origines de cette contamination à *Fusarium* sp. :

- le manque d'hygiène des patients et la non compliance aux recommandations des fabricants ;
- la contamination lors du processus de fabrication des solutions ;
- la contamination des flacons après le processus de fabrication lors du transport ou du stockage ;
- le récent tsunami asiatique et l'ouragan Katrina qui ont causé une modification de l'écosystème naturel et sélectionné des souches plus virulentes de *Fusarium* et peut-être d'autres champignons ;
- la diversité des génotypes retrouvés dans les isolats cliniques ;
- la contamination par *Fusarium* des gouttes de fluoroquinolones utilisées dans le traitement des kératites.

Concernant la compliance et l'hygiène des patients, il a été établi lors de l'épidémie de Singapour que les patients présentaient des conditions d'hygiène défavorables [Khor *et al.*, 2006](83) et que les souches isolées correspondaient aux isolats habituellement présents dans l'environnement de vie tel que dans l'eau des habitations, par exemple [Levy *et al.*, 2006](92). Cependant la chronologie de l'épidémie montre bien une augmentation rapide de

l'incidence et une diminution de celle-ci lors du retrait des solutions ReNu [Gower *et al.*, 2010](90).

Tout au long de l'épidémie, aucune souche de *Fusarium* sp. n'a jamais été isolée dans les usines, ni lors d'aucune étape du processus de fabrication, ni dans les bouteilles de solution [Chang *et al.*, 2006](5). De plus, un élément essentiel de cette épidémie est la diversité génétique des isolats responsables de kératites qui appartiennent à deux complexes d'espèces *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum* et à des génotypes distincts [Chang *et al.*, 2006](5). Des analyses phylogéniques ont mis en évidence des profils moléculaires identiques entre des isolats de kératites et des souches retrouvées dans l'environnement du patient (lentilles de contact, boîtiers). De plus, la diversité génétique des souches isolées lors de kératites est analogue à celle des isolats de l'environnement [O'Donnell *et al.*, 2007](93). Ces données sont donc très largement en faveur d'une contamination environnementale secondaire à une défaillance dans le processus de désinfection des lentilles de contact.

De plus, les études cas témoins montrent un lien avec les solutions de nettoyage ReNu et pas avec les autres types de lotions. La composition des produits Bausch & Lomb a été prise en considération et il est apparu que deux constituants majeurs n'avaient jamais été utilisés jusqu'ici dans les solutions commerciales pour la désinfection des lentilles de contact. Le premier est le dihydrochloride d'alexidine, un agent antimicrobien précédemment utilisé dans les bains de bouche pour le traitement des gingivites et de la plaque dentaire. *In vitro*, le pouvoir antimicrobien de l'alexidine est fortement diminué si cette substance est portée à une température de 56°C dans un conditionnement plastique type ReNu (par rapport à un contenant en verre ou à une conservation à température ambiante) [Elder *et al.*, 2012](94). Le second est le polyquaternium 10, un polysaccharide retenant l'humidité près de la surface de la lentille de contact. Ce dérivé cellulosique sert également de milieu nutritif qui peut faciliter la croissance fongique, particulièrement lors d'une diminution de l'activité antimicrobienne. Ainsi ces deux composants ont joué un rôle très important dans cette épidémie : l'agent antimicrobien, alexidine, thermolabile, qui ne détruit plus les micro-organismes de l'environnement et le polyquaternium 10 qui sert d'agent nutritif pour *Fusarium* sp. [Bullock 2009](89).

En résumé, 5 points clefs favorisant sont à retenir dans l'épidémie de kératites à *Fusarium* de 2005 – 2006 [Epstein 2007](81) :

- Perte d'activité du désinfectant
- Persistance de *Fusarium* sur les lentilles, dans les boîtiers
- Croissance de *Fusarium* grâce à la pellicule de solution de nettoyage à la surface de la lentille
- Porte d'entrée par les micro-traumatismes due à l'insertion quotidienne des lentilles
- Blocage de la réponse inflammatoire par la lentille

En santé publique, cette épidémie a eu pour conséquences d'adapter les réglementations en place pour l'autorisation de mise sur le marché de ces solutions de nettoyage des lentilles de contact. En 2010, les critères requis sont une réduction de 3 log de la concentration bactérienne pour 3 espèces (*Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens* et *Pseudomonas aeruginosa*) et une diminution de 1 log pour une levure (*Candida albicans*) et un champignon filamenteux (*Fusarium solani*). Les limites de ces tests sont : l'utilisation de souches de référence qui peuvent avoir des comportements très différents des isolats environnementaux ou cliniques, l'absence de tests sur des mélanges de micro-organismes, l'absence de tests sur certaines espèces fortement impliquées dans les kératites (*Acanthamoeba* par exemple). De plus, les défauts d'observance ou la mauvaise utilisation des produits devraient être appréhendés pour garantir une innocuité des lentilles de contact [Boost *et al.* 2010](95).

Infections profondes localisées à un seul organe

INFECTIONS CUTANÉES

Fusarium peut être à l'origine d'infections cutanées profondes, touchant le derme et isolées, sans autres organes touchés. Il s'agit de sites primaires d'infections à différencier des métastases cutanées observées dans les formes disséminées. Ces manifestations peuvent survenir chez des patients immunocompétents [Nakamura *et al.*, 2007](96), mais le plus souvent ces fusarioses cutanées touchent des patients à risques tels que les diabétiques [Pai *et al.* 2010](97), les transplantés [Cocuroccia *et al.*, 2003](98), les patients présentant une hémopathie [Pérez *et al.*, 2007](99) ou les brûlés [Latenser 2003](100). Ces lésions sont généralement nécrotiques et peuvent évoluer en ulcères selon le terrain (figure 16).



Figure 16 : Lésion ulcéro-nécrotique à *Fusarium solani* [Pérez *et al.*, 2007](99)

Plus rarement, *Fusarium solani* peut être responsable de kystes sous-cutanés, notamment au niveau du coude comme dans l'observation de Terada *et al.* (101).

SINUSITES

Comme *Aspergillus*, *Fusarium* peut être à l'origine de sinusite quel que soit le statut immunitaire du patient [Kurien *et al.*, 1992](102). Quelle que soit l'étiologie fongique, les manifestations cliniques sont indistinguables avec écoulement et obstruction nasale accompagnées d'un risque de nécrose de la muqueuse [Nucci *et al.*, 2007](11).

LOCALISATIONS ATYPIQUES

Des cas cliniques font état de localisations atypiques d'infections à *Fusarium* telles que des abcès cérébraux [Steinberg *et al.*, 1983](103) ou du sein [Anandi *et al.*, 2005](104), des ostéomyélites [Sierra *et al.*, 2005](105).

Ces champignons peuvent également être à l'origine d'infections urinaires, particulièrement suite à une stase urinaire secondaire à une lithiase [Su *et al.*, 2007](106).

Les corps étrangers sont fréquemment colonisés par *Fusarium* sp. Ainsi une infection récurrente à *Fusarium solani* a été décrite chez un patient avec des antécédents cancérologiques sur une prothèse vocale trachéo-oesophagienne conduisant trois fois à sa destruction [Honraet *et al.*, 2005](107).

Infections disséminées

Une fusariose disséminée est définie par l'invasion de deux sites non contigus faisant évoquer une dissémination hématogène associée ou non à une hémoculture positive.

Le premier cas de fusariose disséminée a été décrit par Cho en 1973 chez un patient présentant une leucémie aigüe [Cho *et al.*, 1973](108). Aujourd'hui, les espèces du genre *Fusarium* sont les seconds agents fongiques filamenteux responsables de mycoses invasives chez l'Homme après *Aspergillus*. Ils représentent ainsi dans les infections fongiques invasives, 20,7 % des filamenteux au Brésil [Aquino *et al.*, 2010](109), 4 % en Italie [Pagano *et al.*, 2006](110) ou 44,4 % des moisissures hors *Aspergillus* à Taïwan [Hsiue *et al.*, 2010](111).

D'un point de vue mycologique, les principaux complexes d'espèces isolés lors de fusarioses invasives sont : *Fusarium solani* (22 %), *Fusarium proliferatum* (11 %), *Fusarium moniliforme* (11 %) et *Fusarium oxysporum* (10 %) d'après une étude internationale multicentrique [Lortholary *et al.*, 2010](43).

La fusariose disséminée touche les patients immunodéprimés, particulièrement ceux présentant une hémopathie et occasionnellement les grands brûlés [Dignani *et al.*, 2004](8) [Capoor *et al.*, 2012](112). Les autres populations particulièrement touchées sont les patients ayant subi une greffe de moelle osseuse, de cellules souches ou d'organes solides [Lodato *et al.*, 2006](113). Chez les patients greffés de moelle osseuse, le risque est d'autant plus important s'il s'agit d'une allogreffe et d'un donneur non apparenté avec non concordance du système HLA. Au décours de la transplantation, trois périodes de risque ont été déterminées : avant la prise de la greffe (médiane J16), entre J61 et J80 et enfin au-delà de J360 [Nucci *et al.*, 2004](114). Un seul cas a été décrit chez un patient séropositif pour le VIH [Guarro *et al.*, 2000](115). Cependant, le facteur de risque reste à déterminer car ce patient présentait de manière concomitante un lymphome. Récemment, une analyse rétrospective d'une série internationale de cas de fusarioses invasives (disséminées ou non) a été réalisée et décrivait les terrains suivants : greffes de cellules souches (18 %), hémopathies malignes (60 %),

immunodépression chronique (12 %) et autres situations (10 %) [Lortholary *et al.*, 2010](43). De manière plus spécifique, une neutropénie, une lymphopénie, une maladie du greffon contre l'hôte, une corticothérapie ou tout autre traitement immunosuppresseur est considéré comme facteur de risque pour une fusariose disséminée [Dignani *et al.*, 2004](8).

Une fusariose disséminée se présente habituellement par une fièvre persistante réfractaire aux antibiotiques et aux antifongiques. Les autres caractéristiques présentes sont une sinusite et/ou une infection rhinocérébrale, une cellulite au niveau d'une zone d'effraction cutanée, une endophtalmie, des lésions cutanées douloureuses, une pneumonie, une myosite et des infections du système nerveux central. De manière exceptionnelle, une localisation myocardique et aortique peut être observée [Busemann *et al.*, 2009](116). Ainsi, presque tous les organes peuvent être atteints, mais la peau est le plus souvent touchée (70 – 90 %), suivie par les poumons et les sinus. Trois types de lésions cutanées peuvent être observées : des lésions multiples et parfois douloureuses (figure 17), des nodules sous-cutanés et des lésions semblables à de l'ecthyma (pyodermite à *Streptococcus* du groupe B), et, moins fréquemment des lésions bulleuses ou en cibles [Dignani *et al.*, 2004](8). Ces lésions sont communément retrouvées au niveau des extrémités [Jensen *et al.*, 2004](117). La peau est souvent le premier point d'appel pour le diagnostic car ces lésions se produisent souvent à un stade précoce de la maladie [Jossi *et al.*, 2010](118).



Figure 17 : Lésions cutanées lors d'une fusariose disséminée [Labois *et al.*, 2011](119)

Douleurs thoraciques, fièvre, toux et hémoptysies surviennent chez les patients avec une atteinte pulmonaire et ne distinguent pas cliniquement la fusariose d'une aspergillose invasive. D'une manière générale, les signes cliniques des patients présentant une fusariose disséminée sont similaires sur de nombreux aspects avec ceux de l'aspergillose invasive. Cependant, dans le cas de l'infection à *Fusarium*, la fréquence des manifestations cutanées est importante et les hémocultures sont positives [Dignani *et al.*, 2004](8). Une fongémie objectivée par la détection de *Fusarium* dans les hémocultures est présente dans 40 % des cas de fusarioses disséminées [Jossi *et al.*, 2010](118).

Alors que le pronostic de l'infection n'est pas lié à l'espèce en cause, la neutropénie joue un rôle important avec un risque accru de dissémination de la pathologie et une mortalité plus importante [Lortholary *et al.*, 2010](43). Dans les différentes séries publiées, une neutropénie persistante est un facteur de mauvaise réponse au traitement [Kontoyiannis *et al.*, 2004](120) [Nucci *et al.*, 2004](114). Le taux de mortalité d'une infection à *Fusarium* chez un patient immunodéprimé varie de 50 à 80 % [Dignani *et al.*, 2004](8). La présence de lésions cutanées disséminées constitue un marqueur de mauvais pronostic [Jossi *et al.*, 2010](118). Concernant la fongémie, les points de vue divergent en fonction des auteurs, lorsqu'elle est isolée, elle est signe de bon pronostic selon une étude [Jossi *et al.*, 2010](118) alors qu'elle constitue le seul facteur de risque indépendant pour une mortalité à 12 semaines dans une série de fusarioses invasives [Campo *et al.*, 2010](121).

DIAGNOSTIC

Diagnostic de l'infection

DIAGNOSTIC DIRECT

Quel que soit le type d'infection à *Fusarium* suspectée et sa localisation, des prélèvements doivent être réalisés pour mettre en évidence le champignon et ainsi documenter la pathologie. Les échantillons collectés sont de natures différentes en fonction de la localisation de la fusariose : produits de grattage cornéen dans le cas de kératites, fragments et poudres d'ongles dans les onychomycoses, tissus prélevés lors de biopsies dans les localisations cutanées ou profondes, hémocultures dans les fusarioses disséminées.

Dans un premier temps, un examen direct est réalisé à la recherche d'éléments fongiques. Il peut être de deux types : mycologique avec l'utilisation de colorants spécifiques pour les champignons tels que le noir de chlorazol ou le blankophor ; ou anatomopathologique grâce à des colorations comme le Grocott, l'HE (hémateïne éosine) ou le PAS (perodic acid Schiff) [Jensen *et al.*, 1997](122). Les filaments visualisés à l'examen direct mycologique ou histologique sont similaires à ceux du genre *Aspergillus*. Il s'agit de filaments hyalins, septés et présentant des embranchements à angles aigus ou droits (figure 18). Toutefois, une sporulation peut être présente dans les tissus et de ce fait, la présence concomitante de filaments et de spores peut suggérer une fusariose chez des patients à risque [Nucci *et al.*, 2007](11).

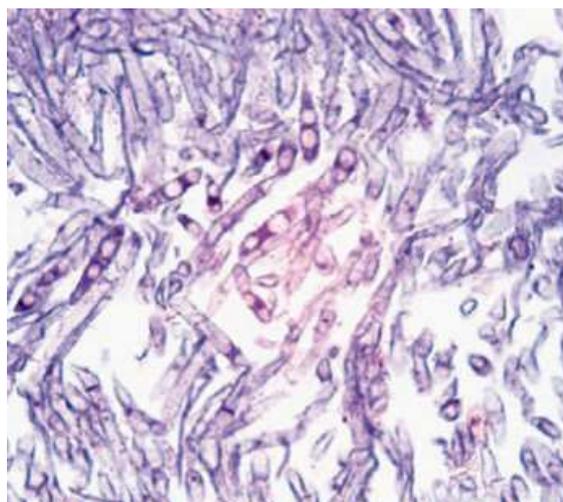


Figure 18 : Eléments fongiques de *Fusarium* lors d'un examen anatomo-pathologique coloré à l'HE [Montone *et al.* 2009](123)

Dès lors, grâce à ces techniques, ni le mycologue, ni l'anatomopathologiste ne sont capables d'établir avec certitude le diagnostic de fusarioses ; les informations fournies doivent se limiter aux trois grands types d'éléments fongiques : levures, filaments septés et filaments non septés. Ainsi, de mauvaises identifications ont été mises en évidence dans 21 % des cas lors d'une étude rétrospective réalisée sur 10 ans [Sangoi *et al.*, 2009](124). La nécessité d'utiliser des techniques plus spécifiques est donc primordiale. La distinction de genre face à un filament sur une pièce d'anatomopathologie est possible grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux spécifiques des principaux genres fongiques [Jensen *et al.*, 1997](122) ou de sondes lors d'hybridation *in situ* [Montone *et al.*, 2009](123). Cependant, ces techniques sont rarement utilisées en routine, le « gold standard » de confirmation reste la culture.

Parallèlement, une culture du prélèvement doit donc être réalisée. Les espèces du genre *Fusarium* poussent facilement et rapidement sur la plupart des milieux en l'absence de cycloheximide. Toutefois, l'interprétation de cette culture est à considérer en fonction du contexte clinique. En effet, les microbiologistes doivent rester prudents car *Fusarium sp.* peut constituer un contaminant de laboratoire. Les éléments en faveur d'une infection sont l'isolement de plusieurs colonies sur un même prélèvement ou du même champignon sur plusieurs prélèvements distincts, un examen direct positif sur le matériel biologique et, surtout, la localisation et le statut immunitaire de l'hôte. Par exemple, une culture fongique à partir d'une aspiration sinusienne ou de sécrétions respiratoires chez un patient

immunodéprimé devrait toujours être considérée comme un élément diagnostique d'une infection à *Fusarium*, contrairement à l'isolement de *Fusarium* sur un grattage de peau chez un individu immunocompétent [Nucci *et al.*, 2007](11).

Dans le cas d'infections disséminées, une méthode spécifique de culture peut être réalisée à partir de prélèvements sanguins périphériques ou centraux grâce aux flacons d'hémocultures. Cette méthode constitue l'une des méthodes les plus efficaces pour établir un diagnostic définitif de fusariose disséminée. De plus, l'utilisation de milieux de culture spécifiques pour les champignons (type Mycosis) permet de diminuer le délai entre l'inoculation du flacon avec le sang du patient et la détection d'une croissance par l'automate [Hennequin *et al.*, 2002](125).

BIOLOGIE MOLECULAIRE

Devant les défauts de sensibilité et spécificité des examens classiques de mycologie (examen direct et culture), des approches moléculaires ont été décrites mais leur place en routine n'est pas encore définie, par défaut de standardisation et après des résultats controversés. Aucune technique moléculaire n'apparaît aujourd'hui dans les recommandations des sociétés savantes pour le diagnostic des infections fongiques invasives. Une PCR panfongique suivie d'une étape d'hybridation a été décrite sur sang total [Van Burik *et al.*, 1998](126). A la même période, une PCR spécifiquement conçue pour la détection du genre *Fusarium* a été développée et utilisée sur le sang et les tissus. Cependant, les essais préliminaires sur un modèle murin présentent des discordances entre les données moléculaires et mycologiques (histologie et culture) [Hue *et al.*, 1999](127). Plus récemment, la double technique PCR panfongique sur le fragment ITS suivie du séquençage de l'amplicon obtenu a été réalisée sur des prélèvements histologiques (frais, fixés au formol ou paraffinés) avec une détection de 93,6 % dans les infections fongiques invasives prouvées par la culture et 64,3 % dans celles prouvées seulement par l'examen anatomopathologique [Lau *et al.*, 2007](128). Une approche plus spécifique par PCR nichée pour la détection de l'ADN de *Fusarium solani* a été évaluée sur modèle murin et montre, pour les lavages broncho-alvéolaires, une bonne concordance avec les techniques classiques mais une sensibilité plus limitée pour les sérums [Ahmad *et al.*,

2010](129). Cependant, ce type de technologie semble peu compatible avec une utilisation en routine du fait des fréquentes contaminations.

Des techniques ciblant de manière concomitante les principaux agents fongiques d'intérêt en mycologie médicale ont été développées. Elles présentent l'avantage de détecter un grand panel de pathogènes simultanément, d'être rapides et utilisables sur les prélèvements cliniques. Cependant, seuls les micro-organismes ciblés seront recherchés, ce qui peut présenter une limite majeure lors de mycoses causées par des espèces atypiques ou rarement fréquentes. Par exemple, *Fusarium solani* fait partie du panel des 24 espèces fongiques détectées sur la puce à ADN développées par l'équipe de Campa [Campa *et al.*, 2008](130). De manière similaire, la technologie Luminex est un système d'hybridation sur microbilles, qui a intégré dans sa gamme d'identification 6 genres de champignons et 69 espèces. Le genre *Fusarium* est détecté par une sonde pan-*Fusarium* capable de se fixer à l'ADN de *F. oxysporum*, *F. proliferatum* et *F. verticilloïdes*. En complément, des sondes spécifiques pour les espèces *F. solani* et *F. oxysporum* ont été développées [Landlinger *et al.*, 2009](131).

IMMUNODIAGNOSTIC

Afin de réaliser une surveillance régulière des patients à risque de développer des mycoses invasives, des techniques d'immunodiagnostic peu invasives telles que la recherche d'antigènes sont utilisées.

La recherche de bêta-D-glucanes, constituants de la paroi d'une grande variété de champignons, constitue un bon complément dans le diagnostic des candidoses, fusarioses, trichosporonoses et aspergilloses avec une sensibilité et une spécificité supérieures à 95 % [Odabasi *et al.*, 2004](132). Cette technique fait d'ailleurs partie des critères biologiques diagnostiques des infections fongiques invasives selon l'EORTC [De Pauw *et al.*, 2008](133). Cependant, une étude de faisabilité récente a montré un taux de bêta-D-glucanes inférieur au seuil de positivité dans le cas d'une fusariose pulmonaire à *Fusarium solani* [Bellanger *et al.*, 2011](134).

Un autre antigène, le galactomannane (encore appelé antigène aspergillaire) est utilisé pour le suivi des patients d'hématologie à risque de développer des aspergilloses invasives. Mais, ce marqueur a également été retrouvé dans des cas de fusarioses invasives en l'absence d'*Aspergillus* [Seyfarth *et al.*, 2008](135). Cette réaction croisée a été confirmée sur des prélèvements sériques de patients atteints de fusarioses mais aussi sur des surnageants de culture [Tortorano *et al.*, 2012](136). Ainsi, en l'absence de culture, la distinction entre fusarioses et aspergilloses ne peut pas être réalisée par l'immunodiagnostic, qui doit toujours être interprété en fonction des autres éléments diagnostiques, des arguments cliniques et des critères d'hôtes.

IMAGERIE

Du point de vue biologique du diagnostic, une fusariose invasive présente de nombreuses similitudes avec une aspergillose invasive. L'imagerie, quant à elle, ne permet pas de disposer d'arguments spécifiques en faveur de *Fusarium* mais évoque une étiologie fongique à champignons présentant un pouvoir angio-invasif. Sur la radiographie du thorax, 25 % des patients présentent des poumons sans particularités, alors qu'au scanner thoracique tous présentent un aspect anormal. Des éléments en faveur d'une infection fongique, tels qu'une masse pulmonaire ou des nodules, peuvent ainsi être observés chez 82 % des patients au scanner mais chez seulement 45 % des patients à la radiographie [Marom *et al.*, 2008](137). Ainsi le scanner thoracique est plus sensible pour la détection des infections fongiques pulmonaires chez les patients immunodéprimés que la radiographie pulmonaire. De plus, les patients infectés par *Fusarium* ne présentent pas le signe du halo, élément scannographique caractéristique de l'aspergillose invasive à un stade précoce [Marom *et al.*, 2008](137).

Identification de l'espèce responsable de l'infection

Le genre *Fusarium* présente une taxinomie complexe et une grande variété de complexes d'espèces peut être à l'origine de fusarioses quelle que soit leur localisation (figure 19) [Short *et al.*, 2011] (18).

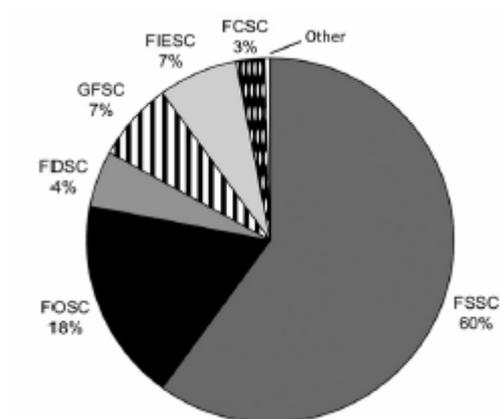


Figure 19 : Fréquence des complexes d'espèces de *Fusarium* parmi 717 isolats cliniques [Short *et al.*, 2011] (18)

Cependant le diagnostic d'espèce est indispensable en clinique, non seulement dans un but épidémiologique pour connaître le spectre des espèces responsables d'infections, mais également à des fins thérapeutiques afin d'adapter les stratégies en fonction des profils de résistance de chacune des espèces.

MYCOLOGIE

Les caractères cultureux communs au genre *Fusarium* ainsi que les critères d'identification morphologiques du complexe d'espèces *Fusarium solani* ont été décrits précédemment. Nous

nous intéressons ici à la différenciation des complexes d'espèces du genre *Fusarium* d'après leurs aspects morphologiques.

Une clé d'identification des espèces du genre *Fusarium* est proposée dans Atlas of Clinical Fungi (tableau 2) [de Hoog *et al.*, 2011](2).

Tableau 2 : Clé d'identification des espèces du genre *Fusarium* [de Hoog *et al.*, 2011](2)

1.a	Colonies atteignant moins de 2 cm de diamètre en 7 à 10 jours ; macroconidies avec 1 à 2 septa	→ 2
1.b	Colonies atteignant plus de 2 cm de diamètre, habituellement 4 à 8 cm en 7 à 10 jours	→ 5
2.a	Macroconidies mesurant plus de 55 µm de long ; chlamydospores absentes	<i>Fusarium aquaeductuum</i>
2.b	Macroconidies courtes mesurant généralement moins de 25 µm de long ; chlamydospores absentes ou présentes	→ 3
3.a	Macroconidies fortement 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 fauves 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 exclusivement sur des monophialides	→ 8
7.b	Microconidies sur des monophialides ou des polyphialides	→ 9
8.a	Microconidies en forme de navets ou citrons présentes	<i>Fusarium napiforme</i>

8.b	Microconidies en forme de navets ou citrons absentes	<i>Fusarium verticilloides</i>
9.a	Chlamydoespores absentes	<i>Fusarium proliferatum</i>
9.b	Chlamydoespores abondantes	<i>Fusarium nygamai</i>
10.a	Cellules conidiogènes polyblastiques fréquentes	→ 11
10.b	Cellules conidiogènes polyblastiques absentes	→ 14
11.a	Colonies rouges ; chlamydoespores abondantes ; blastoconidies prédominantes	<i>Fusarium chlamydosporum</i>
11.b	Colonies roses à violettes ; chlamydoespores 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, en forme d'œufs 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, qui sont pour la plupart latérales ; macroconidies orange en masses, sans cellule de pied distinctes : colonies blanches à violettes, ou beiges 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>

Ainsi, l'utilisation de la clef pour les 4 principaux complexes d'espèces retrouvés en clinique humaine donne les enchainements d'éléments morphologiques caractéristiques suivants :

<i>Fusarium solani</i>	1b > 5b > 6b > 10b > 14b
<i>Fusarium proliferatum</i>	1b > 5b > 6a > 7b > 9a
<i>Fusarium verticilloïdes</i>	1b > 5b > 6a > 7a > 8b
<i>Fusarium oxysporum</i>	1b > 5b > 6b > 10b > 14a

En pratique quotidienne, ces principaux complexes peuvent donc être distingués par l'observation de l'organisation des microconidies et la structure de la phialide sur laquelle elles sont générées. De ce fait, un organigramme de distinction de ces complexes peut être proposé (figure 20).

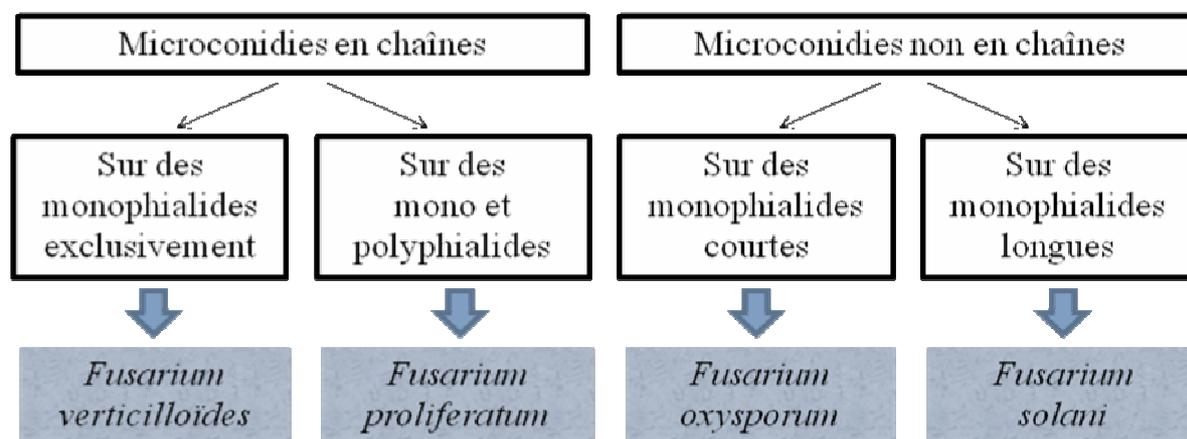


Figure 20 : Distinction morphologique des 4 principales espèces de *Fusarium*

Pour rendre cette identification morphologique plus aisée et moins subjective, quelques photographies des structures caractéristiques sont décrites pour présenter les espèces majeures (figure 21 à 25) [de Hoog *et al.*, 2011](2).

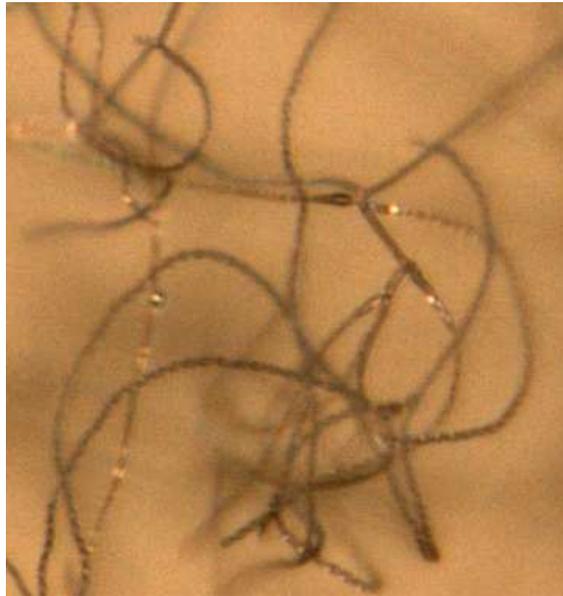


Figure 21 : Microconidies en chaînes de *Fusarium verticilloides* [de Hoog *et al.*, 2011](2)

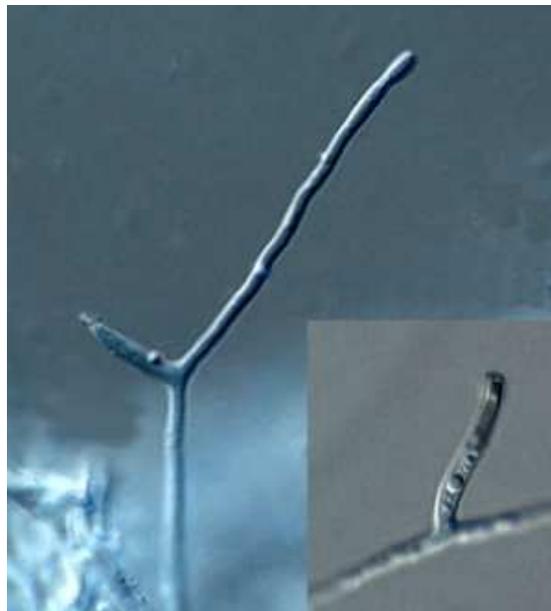


Figure 22 : Monophialides de *Fusarium verticilloides* [de Hoog *et al.*, 2011](2)

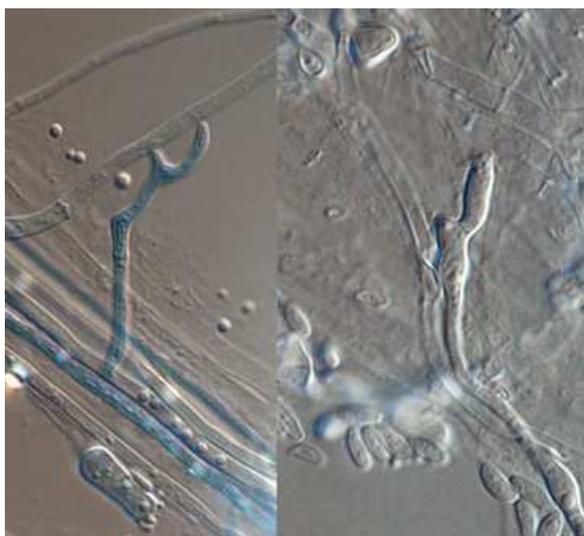


Figure 23 : Polyphialides de *Fusarium proliferatum* [de Hoog *et al.*, 2011](2)



Figure 24 : Monophialides courtes de *Fusarium oxysporum* [de Hoog *et al.*, 2011](2)

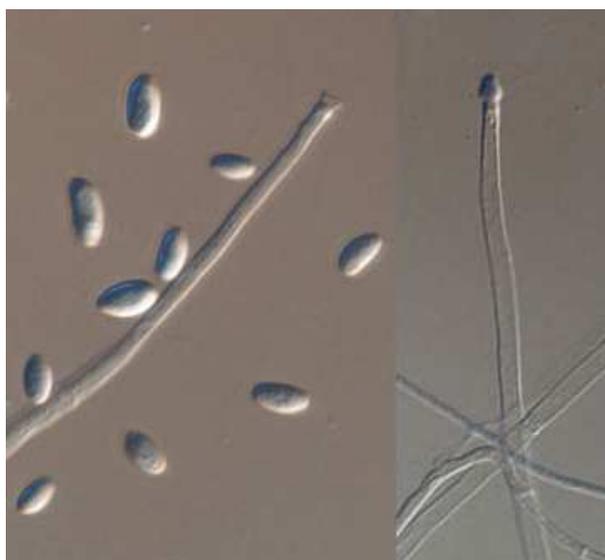


Figure 25 : Monophialides longues de *Fusarium solani* [de Hoog *et al.*, 2011](2)

BIOLOGIE MOLECULAIRE

L'identification morphologique basée sur la culture et les techniques de microscopie est généralement difficile et nécessite une bonne expérience de la part du mycologue. De plus, la mise en évidence des structures spécifiques de chaque espèce en culture nécessite un délai minimum de 3 à 7 jours. Or dans les mycoses invasives, il est bien établi que le délai de diagnostic et de mise en place d'une thérapeutique adaptée conditionne l'évolution et le pronostic de la pathologie. Les techniques de biologie moléculaire offrent ainsi des outils pour palier à ces limites [Oechsler *et al.*, 2009](138).

Actuellement, la cible la plus utilisée en diagnostic moléculaire fongique est le gène codant la région ITS car il présente plusieurs avantages : il est multicopie (une centaine de copies dans le génome des champignons) ; il contient des régions hautement variables entre les genres et des amorces fongiques universelles sont également disponibles. De ce fait, l'étude de ces séquences d'ADN à l'aide des bases de données informatiques permet l'identification d'espèces [Lau *et al.*, 2007](128).

Deux études récentes présentent l'utilisation de la PCR panfongique (cible ITS) suivie de séquençage pour l'identification des *Fusarium* isolés dans les prélèvements oculaires [Alfonso 2008](74) [Oechsler *et al.*, 2009](138). Une méthode semblable ciblant la zone 28S a été décrite sur des souches responsables d'onychomycoses [Ninet *et al.*, 2005](59). D'autres technologies sont également utilisées comme la PCR multiplex avec recherche simultanée de l'ADN fongique et de l'ADN spécifique de *Fusarium solani* [He *et al.*, 2011](73).

Pour le genre *Fusarium*, les techniques de biologie moléculaire basées sur les régions ITS ont été développées en prenant comme référence le concept d'espèce morphologique. Cependant ce mode de détection sous-estime la diversité d'espèces phylogéniques, car ces loci sont trop conservés. Pour le genre *Fusarium*, les gènes les plus intéressants pour identifier les complexes d'espèces ont été évalués (figure 26) [Balajee *et al.*, 2009](139).

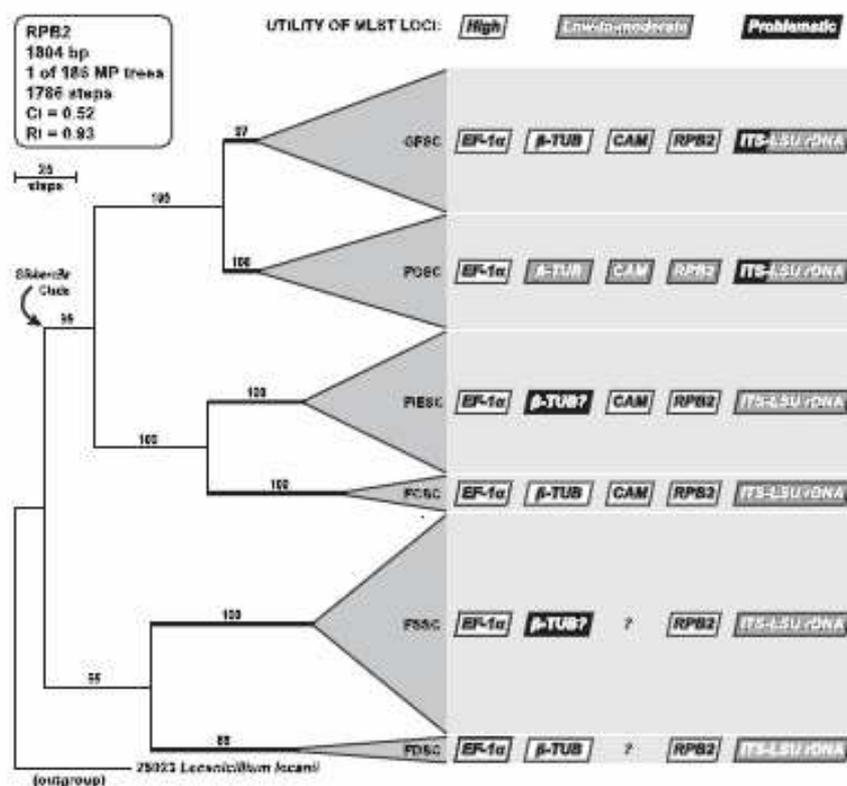


Figure 26 : Utilité des différents loci dans l'identification des principaux complexes d'espèces de *Fusarium* [Balajee *et al.*, 2009](139)

Le gène EF1alpha, codant pour une partie essentielle de la machinerie protéique, est un locus monocopie dans le genre *Fusarium*. Il présente un haut niveau de polymorphisme parmi les espèces phylogénétiquement proches. Pour ces raisons, EF1alpha est devenu un marqueur de choix parmi les outils d'identification utilisant un seul locus [Chandra *et al.*, 2011](140) [Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008](141).

Actuellement, d'autres techniques d'identification existent et font appel à la phylogénie comme la GCPSR (genealogical concordance of multilocus DNA sequence data). La diversité des espèces retrouvées en clinique va donc continuer à augmenter alors que les méthodes phénotypiques resteront inadéquates pour les deux tiers des souches isolées en clinique. Pour *Fusarium*, l'équipe de O'Donnell a proposé un schéma d'identification global reposant sur 3 locus : EF1alpha (translation elongation factor 1 alpha), RPB1 (largest subunit of RNA polymerase) et RPB2 (second largest subunit of RNA polymerase). Deux bases de données : Fusarium-ID (<http://isolate.fusariumdb.org>) et CBS-KNAW Fungal Biodiversity Center

(<http://www.cbs.knaw.nl/fusarium>) hébergent les séquences nucléotiques obtenues lors de l'utilisation de cette méthode [O'Donnell *et al.*, 2010](142). De plus, la plateforme CiF cyber infrastructure for *Fusarium* (<http://www.fusariumdb.org/>) héberge les différents génomes séquencés [Park *et al.*, 2011](7). Un autre schéma de séquençage à partir de 7 loci a été décrit [Wang *et al.*, 2011](143) mais la puissance de celui de O'Donnell réside dans la richesse des bases de données (grande quantité d'isolats et de complexes d'espèces). En pratique courante, une souche inconnue peut être identifiée en séquençant dans un premier temps un des trois locus au choix car chacun de ceux-ci présente une couverture quasiment complète de tout les complexes d'espèces de *Fusarium* observés en clinique [O'Donnell *et al.*, 2010](142). Dans un second temps, une identification multi-locus sera intéressante pour déterminer l'espèce phylogénique au sein du complexe.

SPECTROMETRIE DE MASSE

La spectrométrie de masse par analyse MALDI-TOF (matrix assisted laser desorption ionization - time of flight) est une technique rapide et sensible ayant pris un essor considérable pour la caractérisation des micro-organismes. Cette technique a été appliquée avec succès à l'identification des 9 principaux complexes d'espèces de *Fusarium* responsables d'infections chez l'Homme en utilisant comme méthode de référence le séquençage du locus TEF. Une standardisation de la technique a été réalisée afin d'assurer sa reproductibilité et sa robustesse et une base de données des spectres a été créée. L'atout majeur de cette méthode est le délai court d'obtention du résultat, puisqu'une souche peut être identifiée en une heure seulement [Marinach *et al.*, 2009].

Typage moléculaire

En microbiologie, le typage moléculaire présente des applications variées, notamment en épidémiologie lors de cas groupés d'infections ou en taxinomie ou phylogénie dans le cadre d'études de populations.

En fonction des avancées technologiques, différentes méthodes ont été adaptées au genre *Fusarium*. Initialement, l'électrophorèse en champ pulsé a été utilisée sur différentes sous-espèces de *Fusarium solani*. Le nombre et la taille des chromosomes observés varient entre les sous-espèces alors qu'une plus grande homogénéité a été notée au sein d'une même sous-espèce. L'analyse des chromosomes est une technique lourde mais elle donne cependant des informations sur l'organisation des génomes ou l'évolution globale d'une espèce [Suga *et al.*, 2002](144). Des techniques basées sur la PCR et l'analyse de profils de migrations électrophorétiques ont été comparées pour des populations données de *Fusarium solani*. Ainsi, l'équipe de Godoy a montré que la technique de ERIC-PCR (enterobacterial repetitive intergenic consensus PCR) était plus discriminante que la PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) sur 44 isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani* en mettant en évidence respectivement 39 et 13 génotypes [Godoy *et al.*, 2004](145). La technique ERIC-PCR a été à nouveau comparée à deux autres techniques : Rep-PCR et AFLP (amplification fragment length polymorphism), cette dernière s'avérant la plus intéressante. En effet, les pouvoirs discriminants de ces 3 techniques sont très différents : 0.98 pour AFLP, 0.91 pour Rep-PCR et 0.28 pour ERIC-PCR [Jureen *et al.*, 2008](146). Une technique de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) avec deux sondes ciblant des zones microsatellites a été utilisée en épidémiologie afin d'établir un lien entre des isolats retrouvés dans des solutions de nettoyage de lentilles de contact et dans ceux prélevés au niveau de la cornée des patients [Dyavaiah *et al.*, 2007](33). De manière originale, pour les complexes d'espèces produisant des toxines tels que *Fusarium graminearum*, le typage peut être réalisé grâce à l'analyse de celles-ci [Astolfi *et al.*, 2012].

Suite à l'épidémie sans précédent de kératites à *Fusarium* sp. sur les continents américains et asiatique, il s'est avéré indispensable de disposer d'une technique de typage moléculaire

discriminante et utilisable sur un très grand nombre d'échantillons. Une analyse des polymorphismes de séquences nucléotidiques a donc été initiée par le CDC dans ce contexte [Chang *et al.*, 2006](5). A partir de ces travaux et de ceux de Zhang [Zhang *et al.*, 2006](3), l'équipe de O'Donnell a décrit un schéma de typage sur trois loci d'intérêt (EF1alpha, ITS et RPB2) qui constitue aujourd'hui une référence [O'Donnell *et al.*, 2008](6). La nomenclature du complexe d'espèces de *Fusarium solani* est basée sur celui-ci. Un schéma de MLST basé sur l'analyse des polymorphismes de 5 gènes de ménage a été décrit pour ce complexe dans le but d'une utilisation épidémio-clinique [Debourgogne *et al.*, 2010](147). D'ailleurs la complémentarité de ces deux méthodes a été montrée avec la proposition d'un schéma consensus [Debourgogne *et al.*, 2012](148). Des méthodes analogues d'analyses des polymorphismes de séquences sur deux loci ont également été développés pour les complexes d'espèces de *Fusarium oxysporum* et *Gibberella furjikuroi*. Cependant ces techniques présentent des pouvoirs discriminants assez médiocres [O'Donnell *et al.*, 2009](149) [Migheli *et al.*, 2010](150).

TRAITEMENT

Profil de sensibilité aux antifongiques

La sensibilité ou la résistance aux molécules antifongiques ne prédit pas de l'évolution clinique individuelle d'une fusariose. Cependant, une association existe entre les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) élevées et une faible réponse au traitement antifongique. De ce fait, le profil de sensibilité aux antifongiques des espèces du genre *Fusarium* doit être évalué pour aider au choix de la meilleure stratégie thérapeutique. De plus, le profil de résistance étant spécifique d'une espèce donnée, il peut être appréhendé par une identification d'espèce rigoureuse, notamment par des techniques moléculaires [Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008](141).

Fusarium spp. est résistant *in vitro* à la plupart des molécules antifongiques disponibles en thérapeutique humaine. Dans ce genre, le complexe d'espèces *Fusarium solani* est considéré comme le plus résistant [Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008](141).

Une synthèse des différentes valeurs de CMI du complexe d'espèces *Fusarium solani* vis-à-vis des principaux antifongiques est proposée à partir de données de la littérature depuis 2000 et contenant plus de 10 isolats (tableau 3).

Tableau 3 : Synthèse des différentes études de sensibilité aux antifongiques pour le complexe d'espèces *Fusarium solani*

PARTIE I

Synthèse bibliographique sur FSSC et les fusarioses humaines

Références	n FSSC	CMI (µg/mL)																				
		Amphotericine B			Natamycine			Caspofungine			Anidulafungine			Micafungine			Terbinafine			5 Fluorocytosine		
		GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀
Alastruey <i>et al.</i> 2008 (141)	22	1,33	0,5 - 8	/												29,96	16 - 32	/				
Azor <i>et al.</i> 2007 (151)	27	/	1 - 8	/									/	32 - 256	/	/	32 - 32	/	/	32 - 32	/	
Cordoba <i>et al.</i> 2008 (152)	15	/	1 - 16	/												/	> 64	/				
Cuenca <i>et al.</i> 2006(153)	18	/	/	4																		
Debourgogne <i>et al.</i> 2012 (154)	49	1,2	0,125 - 2	2																		
Espinel <i>et al.</i> 2008 (155)	13	/	0,5 - 4	4																		
Iqbal <i>et al.</i> 2008 (156)	57	/	0,5 - > 8	/	/	4 - 16	/															
O'Donnell <i>et al.</i> 2008 (6)	19	/	0,5 - 16	/	/	2 - 8	/	/	16 - > 16	/	/	16 - > 16	/	/	> 16	/	/	0,5 - 2	/	/	> 64	/
Paphitou <i>et al.</i> 2002 (157)	18	14,8	2 - 16	/																		
Tortorano <i>et al.</i> 2008 (136)	19	1,25	0,25 - 2	/																		
Xie <i>et al.</i> 2008 (40)	34	/	/	2												/	/	4	/	/	64	

PARTIE I

Synthèse bibliographique sur FSSC et les fusarioses humaines

Références	n FSSC	CMI (µg/mL)																				
		Miconazole			Kétoconazole			Fluconazole			Itraconazole			Voriconazole			Posaconazole			Ravuconazole		
		GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀	GM	range	MIC ₉₀
Alastruey <i>et al.</i> 2008 (141)	22										16	16 - 16	/	14	4 - 16	/	16	16 - 16	/	16	16 - 16	/
Azor <i>et al.</i> 2007 (151)	27				/	32 - 32	/	/	128 - 128	/	/	32 - 32	/	/	4 - 32	/	/	32 - 32	/	/	32 - 32	/
Cordoba <i>et al.</i> 2008 (152)	15										/	> 16	/	/	4 - 16	/						
Cuenca <i>et al.</i> 2006(153)	18										/	/	> 8	/	/	> 8	/	/	> 8			
Debourgogne <i>et al.</i> 2012 (154)	49													4,6	1 - 16	8						
Espinel <i>et al.</i> 2008 (155)	13										/	2 - 16	16	/	1 - 16	16						
Iqbal <i>et al.</i> 2008 (156)	57										/	> 8	/	/	8 - > 8	/	/	2 - > 16	/			
O'Donnell <i>et al.</i> 2008 (6)	19										/	4 - > 8	/	/	1 - > 8	/	/	1 - > 8	/			
Paphitou <i>et al.</i> 2002 (157)	18							128	> 64	/				5,8	1 - 8	/	25,3	4 - > 16	/	30,7	16 - > 16	/
Tortorano <i>et al.</i> 2008 (136)	19										> 16	> 16	/	9,21	1 - > 16	/	15,21	1 - > 16	/			
Xie <i>et al.</i> 2008 (40)	34	/	/	16	/	/	16	/	/	64	/	/	32									

Ces différentes données de CMI montrent que *Fusarium solani* est une espèce multirésistante. Seule l'amphotéricine B présente des valeurs modérées et peut donc être considérée *in vitro* comme la molécule la plus active [Azor *et al.*, 2007](151).

Peu de données existent au niveau des mécanismes de résistance mis en œuvre par le champignon contre les molécules antifongiques, à l'exception des échinocandines. Dans ce cas, la résistance intrinsèque repose sur une modification de la cible par mutation F639Y de la protéine FKS1 (sous-unité catalytique de la bêta glucane synthase, cible des échinocandines) [Katiyar *et al.*, 2009](158).

En infectiologie, dans les conditions où les molécules disponibles sont peu efficaces *in vitro* sur le pathogène, les associations de principes actifs peuvent s'avérer intéressantes lorsqu'il existe des synergies entre eux. Pour le complexe d'espèces *Fusarium solani*, trois associations ont été testées : amphotéricine B + voriconazole ; terbinafine + itraconazole ; terbinafine + voriconazole. Seule cette dernière est intéressante puisque qu'elle est synergique pour la totalité des 15 isolats testés [Cordoba *et al.*, 2008](152).

Une nouvelle molécule, E1210, est en cours d'investigation : cet antifongique d'une nouvelle classe présente un mécanisme d'action reposant sur l'inhibition de la synthèse des glycosylphosphatidylinositol, mannoprotéines constitutives de la paroi des champignons. Dans les études préliminaires du spectre d'action, un seul isolat présente une CMI supérieure à 32 alors que pour les 6 autres, les CMI sont inférieures à 0,25 [Miyazaki *et al.*, 2011](159). Cette molécule semble donc intéressante *in vitro* mais également *in vivo* puisqu'elle est associée à une meilleure survie dans un modèle murin de fusariose disséminée, sans toxicité [Hata *et al.*, 2011](160). Les résultats des études cliniques sont donc vivement attendus pour cette nouvelle classe d'antifongiques.

La particularité de *Fusarium solani* est d'être un complexe d'espèces phylogénétiques. Il est donc important d'étudier le profil de sensibilité aux antifongiques des différents clades ou sous-espèces de ce groupe. Aucune différence en termes de CMI n'a été observée au sein de ce complexe, contrairement au complexe d'espèces *Fusarium oxysporum* qui présente des différences de sensibilité pour la terbinafine [Azor *et al.*, 2007](151) [O'Donnell *et al.*, 2008](6) [Azor *et al.*, 2009](161).

D'un point de vue pratique, *Fusarium solani* est un complexe d'espèces multirésistant *in vitro*. Il convient donc de déterminer s'il existe une corrélation entre les CMI obtenues et le succès d'une prise en charge clinique.

Stratégie thérapeutique

ONYCHOMYCOSES

Les onychomycoses, quel que soit l'agent fongique en cause, sont relativement difficiles à traiter puisque un échec au traitement est retrouvé dans 25 à 40 % des cas. Les causes potentielles de cette mauvaise réponse sont le défaut de compliance des patients d'autant plus que les traitements sont longs, l'absence de pénétration de l'antifongique dans l'ongle, la mauvaise biodisponibilité du médicament, les interactions médicamenteuses et la résistance des micro-organismes [Bueno *et al.*, 2010](162). Dans le cas particulier des onychomycoses à *Fusarium* sp. chaque hypothèse est à considérer mais principalement celle de la résistance en raison de la faible sensibilité *in vitro* de ce champignon aux antifongiques disponibles sur le marché. Ainsi, des données spécifiques d'une série de 26 onychomycoses à *Fusarium* montrent un taux de réponse au traitement de 40 % par voie topique et 30 % en systémique (par terbinafine ou itraconazole). Dans cette étude, la meilleure stratégie serait donc le vernis de ciclopirox à 8 % ou la terbinafine par voie topique après avulsion de l'ongle [Tosti *et al.*, 2000](61). Selon des données suisses, une onychomycose ne répondant pas à un traitement bien conduit par terbinafine ou azolés par voie systémique est généralement due à des moisissures et plus spécifiquement au genre *Fusarium*. Il est donc recommandé dans ces circonstances de traiter par amphotéricine B par voie topique associée à l'avulsion de l'ongle infecté [Baudraz-Rosselet *et al.*, 2010](163). Dans ce contexte d'onychomycoses réfractaires au traitement conventionnel, 8 patients ont été traités avec succès par une solution d'amphotéricine B à 2 mg/mL administrée quotidiennement au niveau de l'ongle infecté et des tissus environnants [Lurati *et al.*, 2011](164). Cependant, ces études se basent sur des populations de patients limitées, des stratégies standardisées de prise en charge sont donc aujourd'hui nécessaires pour les onychomycoses à moisissures et plus particulièrement à *Fusarium* sp.

KERATITES

Les kératites à *Fusarium* sp. sont des infections oculaires sévères nécessitant une prise en charge rapide au risque de complications telles que la perte d'un œil. Cependant, comme pour les onychomycoses, il n'existe pas de recommandations en termes de prise en charge de ces infections. Historiquement, l'amphotéricine B et la natamycine sont les produits de référence, de première ligne, pour le traitement topique des kératites à *Fusarium* sp. [Touvron *et al.*, 2009](165) [Dong *et al.*, 2012](166). L'utilisation de cette classe d'antifongiques semble motivée par la relative sensibilité *in vitro* de ce genre fongique. Cependant, le succès thérapeutique ne peut être prédit par la sensibilité aux antifongiques et d'autres facteurs interviennent tels que les facteurs d'hôte, la pénétration de la molécule ou niveau oculaire et la concentration en principe actif [Taylan *et al.*, 2012](167). Les antifongiques de la classe des azolés et notamment, le voriconazole ont été utilisés avec succès dans ce type de pathologie ophtalmologique, soit en première intention ou en traitement de sauvetage avec respectivement 63 et 69 % de succès [Troke *et al.*, 2012](168). Une étude d'efficacité *in vivo* sur modèle animal révèle une évolution clinique comparable pour les trois molécules testées (itraconazole, voriconazole, amphotéricine B) avec cependant, une activité microbiologique plus importante pour l'amphotéricine B que pour les azolés [Yavas *et al.*, 2008](169). A côté du choix de la molécule la plus adaptée, le choix de la voie d'administration et de la formulation sont très importants car ils déterminent la pharmacodynamique et la pharmacocinétique d'un traitement et par conséquent son succès. En effet, le voriconazole et l'amphotéricine B peuvent être administrés à la fois par voie parentérale et en topique, augmentant ainsi leur concentration au niveau du site de l'infection [Polizzi *et al.*, 2004](170) [Touvron *et al.*, 2009](165). L'administration par voie intrastromale du voriconazole est également intéressante avec une action directement *in situ* sans considération de la biodisponibilité de la molécule [Taylan *et al.*, 2012](167). Dans les traitements par amphotéricine B, l'utilisation de nanoparticules pourrait être intéressante permettant ainsi une libération continue et prolongée du produit [Das *et al.*, 2010](171). D'autres molécules, non utilisées habituellement comme antifongiques, ont montré leur efficacité dans des cas sporadiques tels que le polyhexaméthylène biguanide (utilisé dans les infections à

acanthamibes) [Behrens-Baumann *et al.*, 2012](172) ou le cétrimide (désinfectant) [Mahmoud *et al.*, 2007](173). Dans certaines circonstances, la pathologie fongique va progresser malgré la présence d'un traitement médicamenteux, nécessitant alors une prise en charge chirurgicale, telle qu'une kératectomie superficielle, une kératoplastie ou une transplantation de membrane amniotique dans les cas les plus sévères [Lin *et al.*, 2005](174).

INFECTIONS PROFONDES OU DISSEMINÉES

Devant le pronostic généralement sombre des fusarioses disséminées, il est impératif de débiter le plus rapidement un traitement efficace chez les patients déjà fragilisés par une pathologie sous-jacente. Les données *in vitro* de sensibilité aux antifongiques montrent des résultats disparates en fonction des espèces mais d'une manière globale, le genre *Fusarium* sp. est peu sensible aux molécules disponibles en thérapeutique humaine. Cependant, aucune corrélation entre les données *in vitro* de CMI et *in vivo* d'évolution clinique n'a été démontrée dans le cas des fusarioses [Lortholary *et al.*, 2010](43). De plus, lors de cette infection, aucune étude clinique randomisée avec plusieurs stratégies thérapeutiques n'a été réalisée et le rôle de la reconstitution immunitaire n'est pas encore complètement appréhendé [Nucci *et al.*, 2007](11). Toutes ces difficultés expliquent l'absence de recommandations de stratégie thérapeutique par les grandes sociétés savantes internationales. Aujourd'hui, le point de vue de Nucci et Anaissie constitue une référence en terme de stratégie thérapeutique et de prise en charge d'une fusariose disséminée [Nucci *et al.*, 2007](11). Quatre principaux points d'impact sur la pathologie ont été considérés : le traitement antifongique, l'immunothérapie (pour accélérer la reconstitution immunitaire), la chirurgie et la prise en charge du cathéter (tableau 4).

Tableau 4 : Recommandations pour la prise en charge d'une fusariose invasive[Nucci *et al.*, 2007](11)

Traitement antifongique	<ul style="list-style-type: none"> • <i>F.solani</i> et <i>F.verticillioïdes</i> : forte dose d'amphotéricine B • Autres espèces de <i>Fusarium</i> : forte dose d'amphotéricine B ou voriconazole • Réaliser une étude de la sensibilité aux antifongiques
Immunothérapie	<ul style="list-style-type: none"> • Patients neutropéniques : facteurs de croissance (G-CSF ou GM-CSF) ou transfusions de polynucléaires • Patients non neutropéniques : interférons gamma et/ou GM-CSF
Chirurgie	Débridement de la lésion nécrotique
Prise en charge du cathéter	Retrait du cathéter veineux central dans le cas d'une fongémie isolée

Il n'existe pas de standardisation de la prise en charge des fusarioses invasives. Cependant, des études rétrospectives et des descriptions de cas cliniques rapportent un succès thérapeutique suite à l'utilisation de l'amphotéricine B, le voriconazole ou le posaconazole. Les principales caractéristiques de pharmacocinétique et de pharmacodynamique ainsi que l'efficacité clinique de ces trois antifongiques sont donc décrites.

Amphotéricine B

L'amphotéricine B est un polyène qui agit par fixation à l'ergostérol, engendrant une perte d'intégrité de la membrane cellulaire fongique et conduisant à la mort de la cellule. Cette molécule est fortement liée aux protéines sériques induisant une faible pénétration dans les fluides et tissus biologiques. Administré par voie intraveineuse, ce traitement est toxique avec des effets indésirables fréquents tels que : insuffisance rénale, fièvre, malaise, perte de poids, céphalées, hypotension, douleurs abdominales, vomissements, diarrhées, anémie normocytaire normochrome et myalgies. De ce fait, l'utilisation des formes liposomales, moins toxiques mais plus coûteuses, est privilégiée. L'amphotéricine B est fongistatique ou fongicide en fonction de la concentration tissulaire [Muhammed *et al.*, 2011](175).

En terme d'efficacité, d'après une étude rétrospective portant sur 26 patients présentant une fusariose invasive traitée par amphotéricine B en première ou seconde ligne, 46 % des patients ont présenté une amélioration ou une guérison de leur infection et 12 % une

stabilisation de leur fusariose [Perfect 2005](176). Sur une population plus importante de 84 patients, la réponse au traitement par amphotéricine B est de 32 % et à 30 jours de suivi après le diagnostic de la fusariose, 50 % des patients sont décédés [Nucci *et al.*, 2003](44).

Voriconazole

Le voriconazole est un antifongique synthétique appartenant à la classe des triazolés, qui inhibe la 14 alpha lanostérol déméthylase pendant la biosynthèse de l'ergostérol. Il peut être administré par voie orale ou intraveineuse et présente une excellente diffusion tissulaire. Le voriconazole est métabolisé majoritairement au niveau hépatique grâce aux cytochromes CYP2C19, CYP2C9 et CYP3A4, ce qui induit des interactions médicamenteuses avec les autres molécules métabolisées par ces mêmes enzymes. Les effets secondaires sont des troubles de la vision et dans de rares cas une hépatotoxicité. De plus, cette molécule est tératogène [Muhammed *et al.*, 2011](175).

Une étude clinique multicentrique a été réalisée pour tester l'efficacité et la tolérance de cette molécule dans le traitement des infections fongiques émergentes et réfractaires à la thérapeutique. Onze patients présentant une fusariose invasive ont été inclus et la réponse au traitement a été de 45 % avec des effets secondaires modérés [Perfect *et al.*, 2003](177). Une étude multicentrique rétrospective a récemment montré un taux de réponse de 47 % dans le traitement de la fusariose sur une population de 73 patients traités par voriconazole, en première ligne ou non, sans différence significative entre ces deux groupes [Lortholary *et al.*, 2010](43).

Posaconazole

Le posaconazole est un azolé de troisième génération à large spectre. Il est administré par voie orale et présente un grand volume de distribution. Il est métabolisé au niveau hépatique par glucoronidation et les métabolites inactifs sont excrétés par les reins. Les effets secondaires de cette molécule sont : fièvre, céphalées, asthénie, œdèmes périphériques, anorexie, hyper ou hypotension, tachycardie, anémie, neutropénie, thrombopénie, diarrhée, vomissements, douleurs abdominales, troubles électrolytiques, toux, dyspnée, rash et prurit. La formulation

exclusivement orale limite l'utilisation du posaconazole chez les patients en état critique, mais l'administration par sonde nasogastrique est possible [Muhammed *et al.*, 2011](175).

Une étude rétrospective basée sur 21 cas de fusarioses chez des patients réfractaires ou intolérants à la thérapeutique usuelle montre que l'utilisation du posaconazole en monothérapie permet une réponse partielle ou complète dans 48 % des cas [Raad *et al.*, 2006](178).

Des cas cliniques montrent le succès thérapeutique d'associations d'antifongiques comme l'amphotéricine B et le voriconazole [Guzman Cottrill *et al.*, 2004](179). Cependant, ces données sont controversées puisque dans l'étude rétrospective de Lortholary, l'évolution entre l'utilisation du voriconazole en monothérapie et en association avec un autre antifongique n'est pas significativement différente [Lortholary *et al.*, 2010](43). Différentes hypothèses pharmacodynamiques peuvent expliquer l'absence de synergie entre le voriconazole et l'amphotéricine B. En effet, la synthèse de l'ergostérol est inhibée par les azolés alors que ce stérol est la cible de l'amphotéricine B. De la même manière, l'amphotéricine B modifie l'intégrité de la membrane de la cellule fongique, ce qui modifie l'influx des azolés [Muhammed *et al.*, 2011](175).

Cependant, certaines molécules antifongiques semblent présenter des propriétés d'immunomodulation, potentiellement intéressantes en complément d'une activité antifongique. En effet, l'amphotéricine B, quelle que soit sa formulation, augmente la phagocytose des filaments de *Fusarium* par les polynucléaires neutrophiles et les monocytes [Dotis *et al.*, 2008](180). D'une manière analogue, la caspofungine, sans activité antifongique directe sur *Fusarium*, permet une augmentation de la destruction des filaments par les polynucléaires neutrophiles en augmentant l'exposition des bêta-glucanes au niveau de la paroi fongique [Lamaris *et al.*, 2008](181).

Dans le cas des fusarioses profondes localisées, des approches thérapeutiques originales sont rapportées : telle que l'administration *in situ* de l'antifongique comme l'injection intra-articulaire de voriconazole [Kawashima *et al.*, 2012](182) ou le traitement par la chaleur (application quotidienne d'une poche chauffée pendant 30 minutes sur la lésion) [Nakamura *et al.*, 2007](96).

Le traitement antifongique peut également être complété par des traitements adjuvants. Le débridement chirurgical des lésions cutanées est intéressant pour réaliser une détersion mécanique [Muhammed *et al.*, 2011](175). De plus, il a été démontré que le taux de polynucléaires neutrophiles jouait un rôle dans la réponse au traitement [Lortholary *et al.*, 2010](43). L'utilisation d'adjuvants accélérant la reconstitution immunitaire tels que les injections de G-CSF, GM-CSF ou les transfusions de polynucléaires peut donc être recommandée comme la réduction des doses de traitements immunosuppresseurs [Muhammed *et al.*, 2011](175).

PARTIE II

TYPAGE MOLECULAIRE

DU

COMPLEXE D'ESPECES

FUSARIUM SOLANI

Article 1 :

Journal of Microbiological Methods 82 (2010) 319–323



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Development of a new MLST scheme for differentiation of *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) isolates

Anne Debourgogne ^{a,*}, Cécile Gueidan ^{b,c}, Christophe Hennequin ^{d,e,f,g}, Nelly Contet-Audonneau ^a, Sybren de Hoog ^b, Marie Machouart ^a

^a Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpitaux de Nancy, CHU Brabois, 11 allée du Morvan, 54511 Vandœuvre-les-Nancy, France

^b CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, The Netherlands

^c The Natural History Museum, Botany Department, Cromwell road, London, SW7 5BD, United Kingdom

^d Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Faculté de Médecine Pierre et Marie Curie, site St. Antoine, 27 rue de Chaligny, 75012 Paris, France

^e Université Pierre et Marie Curie-Paris6, UMR5594S, Paris, France

^f AP-HP, Hôpital St Antoine, Service Parasitologie-Mycologie, Paris, France

^g INSERM, U945, Paris, France

ARTICLE INFO**Article history:**

Received 21 April 2010

Received in revised form 5 July 2010

Accepted 6 July 2010

Available online 2 August 2010

Keywords:

Diagnosis

Epidemiology

Fusarium solani Species Complex

MLST

Typing

ABSTRACT

Fungi belonging to the *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) are well known plant pathogens. In addition to being the causative agent of some superficial infections, FSSC has recently emerged as a group of common opportunistic moulds, mainly in patients with haematological malignancies. Molecular typing methods are essential in order to better understand the epidemiology of such opportunistic agents with the final goal of preventing contamination. A three-locus typing scheme has thus been developed for FSSC; based on polymorphisms in the domains of the ITS, EF-1 alpha, and RPB2 genes. This method is now considered to be a useful reference for phylogenetic and taxonomic studies. In other significant clinical fungi (e.g. *Candida* sp., *Cryptococcus neoformans*, and *Aspergillus fumigatus*), genes coding for metabolic enzymes have been widely used and proven to be very informative for diagnosis and epidemiology. The contribution of these genes has never been evaluated for *Fusarium* sp. and more specifically for *F. solani* Species Complex.

Here, we have evaluated the contribution of 25 genes for diagnosis and epidemiological purposes. We then report a new five-locus MLST scheme useful for diagnosis and typing of clinical FSSC isolates. The method has been validated on 51 epidemiologically unrelated strains of FSSC and presents a high power of discrimination calculated at 0.991.

© 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

Article 2 :

Journal of Microbiological Methods 91 (2012) 65–72



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmeth

Comparison of two DNA sequence-based typing schemes for the *Fusarium solani* Species Complex and proposal of a new consensus method

Anne Debourgogne ^{a,b,*}, Cécile Gueidan ^{c,d}, Sybren de Hoog ^e, Alain Lozniewski ^{e,f}, Marie Machouart ^{a,b}

^a Service de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nancy, Hôpitaux de Brabois, 11 allée du Morvan, 54511 Vandœuvre-les-Nancy, France

^b Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, EA4369 Relations Hôtes Environnement Micro-organismes, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-les-Nancy, France

^c CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, Netherlands

^d The Natural History Museum, Botany Department, Cromwell road, London, SW7 5BD United Kingdom

^e Service de Bactériologie, CHU de Nancy, Hôpital Central, Avenue Maréchal de Lattre de Tassigny, 54000 Nancy, France

^f Laboratoire de Bactériologie, EA4369 Relations Hôtes Environnement Micro-organismes, Faculté de Médecine, 9 avenue de la Forêt de Haye, 54505 Vandœuvre-les-Nancy, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 May 2012

Received in revised form 3 July 2012

Accepted 9 July 2012

Available online 17 July 2012

Keywords:

Fusarium solani Species Complex (FSSC)

MLST

Phylogeny

Typing

Epidemiology

ABSTRACT

Multilocus sequence typing (MLST) is a widely used approach for differentiating microbial isolates presenting many advantages such as easy access through online databases and straightforward interpretation. For the *Fusarium solani* species complex (FSSC), three gene regions have been widely used to investigate phylogenetic relationships at the interspecific level (ITS-nuLSU, EFLa, RPB2) and a nomenclature system has been proposed for the different known haplotypes. More recently, a MLST scheme was proposed for this species complex based on the polymorphisms of five housekeeping genes (ACC, ICL, GDP, MDP, SOD). Here, we compare the phylogenetic resolution and sequence discriminatory powers of these two sets of loci on 50 epidemiologically unrelated FSSC strains. Although the widely used gene set offers better phylogenetic resolution, the newly developed gene set is slightly better at discriminating isolates using a MLST method. A consensus scheme of eight loci is proposed for typing FSSC strains combining the advantages of the two previous gene sets and offering the best typing efficiency.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Les méthodes de typage sont utilisées pour étudier la dynamique de population ou de propagation d'un micro-organisme dans des milieux cliniques ou environnementaux, à des niveaux allant de l'hôte unique à un écosystème mondial [van Belkum *et al.*, 2007](183).

En pratique, les applications sont diverses :

- taxonomie des micro-organismes ;
- surveillance épidémiologique des maladies infectieuses ;
- documentation des épidémies ;
- étude de la pathogénèse et de la progression d'une infection ;
- analyse des génétiques de population.

Avant qu'une méthode de typage soit utilisée dans une situation donnée, sa pertinence doit avoir été clairement démontrée. Chaque méthode de typage doit donc être évaluée et validée par rapport à un certain nombre de critères. Ceux-ci peuvent être divisés en critères de performance et de commodité. La technique choisie doit donc *a minima* être stable, reproductible, discriminante, concordante avec les données épidémiologiques et présenter une grande typabilité. Une méthode de typage idéale et universelle n'existe pas, cependant un besoin croissant d'échanges de données et de communication entre laboratoires implique une standardisation de ces techniques [van Belkum *et al.*, 2007](183).

Depuis les deux dernières décennies, une pléthore de techniques nouvelles et innovantes a été développée. Les technologies utilisées vont de la comparaison de fragments d'ADN génomique au séquençage. Actuellement, dès que le génome d'un micro-organisme est connu, les techniques de typage moléculaire à privilégier sont l'analyse des microsatellites ou la MLST.

Le complexe d'espèces *Fusarium solani* a fait l'objet de différentes méthodes de typage évoluant au fil des avancées technologiques en allant de l'électrophorèse en champ pulsé des chromosomes à l'AFLP [Suga *et al.*, 2002](144) [Jureen *et al.*, 2008](146). Malgré l'importance clinique de ce pathogène et l'implication récente de celui-ci dans une épidémie de kératites sur plusieurs continents, peu de techniques récentes de typage ont été décrites. En effet, aucune analyse par microsatellites n'a été publiée, contrairement au complexe d'espèces *Fusarium oxysporum* [Mahfooz *et al.*, 2012](184). La documentation de l'épidémie repose sur une analyse des polymorphismes de séquences nucléotidiques initiée par le CDC [Chang *et al.*, 2006](5). A partir de ces travaux et de ceux de Zhang [Zhang *et al.*, 2006](3), un schéma de typage sur trois loci d'intérêt (EF1alpha, ITS et RPB2) a été utilisé sur un panel très conséquent d'échantillons et est considéré comme référence [O'Donnell *et al.*, 2008](6).

Cependant, cette précédente technique ne répond pas strictement à la définition de MLST. En effet, cette dernière doit être basée sur l'analyse des polymorphismes nucléotidiques et évalue la variation des séquences d'ADN entre les allèles de 5 à 10 gènes de ménage, peu soumis aux pressions de sélection et dont l'expression est indispensable au métabolisme de la cellule [Maiden *et al.*, 1998](185). Son intérêt majeur réside dans l'établissement d'importantes bases de données partagées.

La méthode de typage MLST a précédemment été utilisée pour étudier des populations d'autres champignons pathogènes tels que *Candida albicans* [Bougnoux *et al.*, 2002](186), *Candida glabrata* [Dodgson *et al.*, 2003](187), *Candida tropicalis* [Tavanti *et al.*, 2005](188), *Candida krusei* [Jacobsen *et al.*, 2007](189), *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* [Feng *et al.*, 2008](190) [Meyer *et al.*, 2009](189), *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* [Litvintseva *et al.*, 2006](191) [Meyer *et al.*, 2009](192) et *Aspergillus fumigatus* [Bain *et al.*, 2007](193).

PROBLEMATIQUE

Le complexe d'espèces *Fusarium solani* est redouté en pathologie humaine puisqu'il est l'agent étiologique de mycoses invasives de mauvais pronostic mais aussi en agriculture car il peut détruire des plantations céréalières, il s'avère donc intéressant de disposer d'une technique de typage moléculaire pour ce pathogène.

Une technique de MLST *sensu stricto*, comparable à celles des autres champignons, a donc été développée et validée selon les recommandations du groupe de travail sur les marqueurs épidémiologiques de la société européenne de microbiologie clinique et de maladies infectieuses [van Belkum *et al.*, 2007](183).

Dans le même temps, la représentativité de la population test au sein du complexe d'espèces devait être appréciée afin d'assurer la qualité du schéma développé. De ce fait, la détermination des haplotypes selon la nomenclature décrite par O'Donnell [O'Donnell *et al.*, 2008](6) a été réalisée pour chacun des isolats étudiés.

Cette dernière méthode est utilisable pour préciser la position des souches au sein du complexe d'espèces *Fusarium solani* mais aussi à des fins de typage moléculaire. Les deux techniques de typage disponibles pour ce micro-organisme ont donc été comparées sur des aspects phylogéniques et de discrimination.

En dernier lieu, la comparaison des caractéristiques moléculaires des isolats a été réalisée en fonction de l'origine des isolats : cliniques ou environnementaux.

MATERIELS & METHODES

Souches du complexe d'espèces *Fusarium solani* étudiées

Pour le développement d'une technique de typage moléculaire, le choix de la population à analyser est un pré-requis important, garant d'une validation de méthode optimale. Cinquante et un isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani* sans lien épidémiologique ont donc été sélectionnés pour cette étude (et 50 lors de la comparaison des méthodes de typage). Ces souches présentent des origines variées : souches cliniques, végétales, environnementales et proviennent de zones géographiques diverses.

Ces isolats étaient disponibles dans notre propre collection de champignons ou nous ont été fournis par des collaborateurs. Toutes ces souches ont été déposées au Centre de Biodiversité Fongique CBS-KNAW (<http://www.cbs.knaw.nl>). La correspondance du numéro de collections avec les caractéristiques de chaque isolat est consignée dans le tableau 5.

Tableau 5 : Référence CBS et caractéristiques épidémiologiques de la population de FSSC étudiée

Référence collection CBS	Localisation	Origine géographique
124633	Ongle	France (Nancy)
124894	Peau	France (Paris)
124632	Peau	France (Paris)
124901	Peau	France (Paris)
124631	Ongle	France (Paris)
124630	Peau	France (Paris)
124629	Ongle	France (Paris)
124895	Peau	France (Paris)
124896	Sang	Belgique
124628	Ongle	France (Paris)
124623	Environnement	France (Paris)
124889	Ongle	France (Paris)
124627	/	/
124890	Ongle	France (Nancy)
124897	Peau	Gabon

PARTIE II

Typage Moléculaire de FSSC

124891	Peau	Gabon
124898	Peau	Gabon
124892	Ongle	Gabon
124899	Ongle	Gabon
124893	Ongle	France (Limoges)
124900	Pied	France (Limoges)
124626	/	/
125013	/	France (Lille)
124625	Cornée	France (Lille)
124624	Ongle	France (Nancy)
102824	Fragment d'assiette	Colombie
241.93	Mycétome	Suriname
115695	/	/
208.29	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Allemagne
181.29	<i>Solanum tuberosum</i>	Allemagne
119996	<i>Daucus carota</i>	Hollande
119223	<i>Daucus carota</i>	Espagne
118931	<i>Solanum lycopersicum</i>	Royaume Uni
117481	<i>Liriodendron tulipifera</i>	USA

PARTIE II

Typage Moléculaire de FSSC

115659	<i>Potato cultivar Maritta</i>	Allemagne
165.87	<i>Solanum tuberosum</i>	Danmark
318.73	<i>Trichosanthes dioica</i>	Inde
222.49	<i>Euphorbia fulgens</i>	Hollande
231.31	<i>Quercus garyana</i>	USA
121450	Vigne	Syrie
115660	Pomme de terre	Egypte
115658	Pomme de terre	Israel
115045	<i>Calamus Palmae</i>	Hong Kong
166.87	Sol sous <i>Castanea</i>	USA
109028	Nodule sous cutané	Suisse
108942	Gros orteil	Hollande
490.63	Homme	Japon
224.34	Ongle gros orteil	Cuba
112100	Prothèse vocale	Belgique
117608	Lésion du bras	Turquie
116746	Cheveux	Ghana

Chaque échantillon a été stocké à – 80°C dans un mélange eau / glycérol (1/1) et ensuite repiqué sur milieu à l'extrait de Malt et incubé à + 30°C jusqu'à la formation des conidies.

Choix des loci d'intérêt pour le développement d'un schéma de MLST

Dans une méthode MLST, l'analyse des polymorphismes nucléotidiques est réalisée sur des gènes de ménage codant pour des fonctions métaboliques. La sélection initiale a donc porté sur des loci précédemment utilisés dans des schémas de MLST pour d'autres espèces fongiques, telles que *Candida albicans* [Bougnoux *et al.*, 2002](186), *Candida glabrata* [Dodgson *et al.*, 2003](187), *Candida tropicalis* [Tavanti *et al.*, 2005](188), *Candida krusei* [Jacobsen *et al.*, 2007](189), *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* [Feng *et al.*, 2008](190) [Meyer *et al.*, 2009](189), *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* [Litvintseva *et al.*, 2006](191) [Meyer *et al.*, 2009](192) et *Aspergillus fumigatus* [Bain *et al.*, 2007](193).

Le génome de *Fusarium solani* (*Nectria haematococca*) a été séquencé en 2007 par the Joint Genome Institute [Coleman *et al.*, 2009](10) ; [Rep *et al.*, 2010](30). Cependant, au moment du développement du schéma de MLST, toutes les annotations n'étaient pas finalisées et la recherche des différents gènes de ménage homologues sélectionnés n'a donc pu être réalisée à partir du génome. Ces homologues ont donc été recherchés chez d'autres espèces de *Fusarium* sp. telles que *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum* et *Fusarium verticilloïdes* à partir des bases de données GenBank [<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>] et Broad Institute [http://www.broadinstitute.org/annotation/genome/fusarium_group/MultiHome.html]. Pour un gène donné, les séquences de chaque espèce ont été alignées en utilisant le programme AliBee disponible sur le site bio-informatique GeneBee [http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html]. Des couples d'amorces ont été dessinés dans les régions conservées afin d'amplifier des fragments de 500 à 700 paires de bases. Les fragments amplifiés avec succès ont été ensuite séquencés et analysés afin de sélectionner les loci, qui analysés en combinaison permettent de différencier un maximum d'isolats au sein de la population étudiée.

Étapes du processus analytique

EXTRACTION D'ADN

L'ADN des souches étudiées a été extrait à partir des cultures fongiques en utilisant le kit High Pure PCR Template Preparation kit commercialisé par Roche Diagnostics, Meylan, France. Le protocole recommandé par le fournisseur a été légèrement modifié en ajoutant une étape de pré-traitement. Un aliquot de mycélium est mis en suspension dans 200 μL de tampon de lyse du kit et incubé pendant 30 minutes à 37°C en présence de lyticase (concentration finale de 10 U/ μL). La suite de l'extraction est réalisée selon les instructions du fournisseur.

AMPLIFICATION

La réaction de PCR a été réalisée dans un volume total de 50 μL contenant les éléments ci-dessous.

Composition du mélange (pour un tube) :

Tampon 10X + MgCl_2 : 5 μL

dNTP (2 mM) : 5 μL

Amorce sens (40 μM) : 0.5 μL

Amorce anti-sens (40 μM) : 0.5 μL

Fast Start Taq DNA Polymerase (5U/ μl) : 0.4 μL

Eau qsp : 50 μL

ADN extrait : 2 ou 5 μL selon les cas

Des amorces ont été soit dessinées pour les loci sélectionnés pour le développement du schéma de MLST, soit reprises des publications originales pour les loci décrits dans la littérature (tableau 6) [O'Donnell *et al.*, 2008](6).

Tableau 6 : Amorces utilisées et taille des amplicons

Locus	Nom	Amorces (sens : F et anti-sens : R)	Taille (paires de bases)
FsACC	AcetylCoA carboxylase	F, 5'-CTCGTGAGATCATGATCCAGT-3' R, 5'-GTTGATAACAGCGGAGAGCT-3'	683
FsICL	Isocitrate lyase	F, 5'-GGAGGTTGAGGCTGTCAAG-3' R, 5'-GCTTGGTGAGCTTCATGACA-3'	626
FsGPD	Glyceraldehyde 3P deshydrogenase	F, 5'-CATGTACGTCGTCGGTGTCA-3' R, 5'-CGCTTACTTGGAGGCATCG-3'	633
FsMPD	Mannitol 1P deshydrogenase	F, 5'-CGTCGAGAACACCATCACAAA-3' R, 5'-ATGGGGGTTGCCAATTCGCT-3'	688
FsSOD	Superoxyde dismutase	F, 5'-TGGGACATCACCGGTAACGA-3' R, 5'-CAGTCTTGAGAGACTCCTCG-3'	479
EF1 α	Facteur d'élongation	EF1, 5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC-3' EF2, 5'-GGARGTACCAGTSATCATG-3'	716
ITS-nuLSU	Région intergénique et large sous unite ribosomique nucléaire	ITS5, 5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3' NL4, 5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3'	986
RPB2	ARN polymérase	5f2, 5'-GGGGWGAYCAGAAGACGG-3' 7cr, 5'-CCCATRGCTTGYTTRCCCAT-3' 7cf, 5'-ATGGGYAARCAAGCYATGGG-3' 11ar, 5'-GCRTGGATCTTRTCRTCSACC-3'	1738

Un thermocycleur iCycler IQ Thermal cycler (BioRad, France) a été utilisé selon le programme suivant.

Programme d'amplification

Dénaturation initiale : 3 min à 94°C

Dénaturation : 1 min à 94°C

Hybridation : 1 min à 59°C

Elongation : 1 min à 72°C

Elongation finale : 5 min à 72°C

} 30 cycles

A la fin de la réaction, une électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % en présence d'agents intercalants a été réalisée avec 5 µL d'amplicons et visualisée sous UV.

SEQUENÇAGE

Dans un premier temps, les réactions de séquençage ont été réalisées dans notre laboratoire. Les produits de PCR ont donc été purifiés en utilisant le kit QIAquick PCR purification (Qiagen, France) et séquencés sur les deux brins en utilisant les amorces d'amplification. La réaction de séquençage a été menée en utilisant le kit Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, France) sur ABI PRISM Genetic Analyser (PE Applied Biosystems).

Dans un second temps, les amplicons ont été transmis à la société GenoScreen pour être séquencés.

ANALYSE DES POLYMORPHISMES

Les chromatogrammes des séquences d'ADN sens et anti-sens ont été analysés en utilisant le logiciel BioEdit [Tippmann 2004](194) et chaque séquence obtenue et vérifiée a été déposée dans la banque de données Genbank (Annexe 1). Les sites de polymorphismes nucléotidiques ont ensuite été identifiés par alignement multiple sur BioEdit [Tippmann 2004](194) et MacClade 4.06 [Maddison *et al.*, 2003] pour tous les isolats étudiés et vérifiés à nouveau sur les chromatogrammes. Pour chaque locus, un nombre a été attribué pour un variant allélique unique. La combinaison de ces différents nombres a abouti à la détermination d'un profil pour chaque isolat analysé.

Validation analytique de la méthode

POUVOIR DISCRIMINANT

Le pouvoir discriminant d'une technique de typage est mesuré par l'indice de diversité de Simpson, calculé selon la formule de Hunter et Gaston [Hunter *et al.*, 1988](195):

$$D = 1 - (1 / N (N - 1)) \sum a_j$$

Avec N le nombre de souches utilisées et a_j le nombre de souches indifférentiables d'une souche donnée.

Cet indice est basé sur la probabilité que deux souches inapparentées isolées d'une population test soient placées dans différents groupes en termes de typage. Il doit atteindre au moins 95 % pour que le système de typage étudié soit considéré comme discriminant [Struelens 1996](196).

EFFICACITE DE TYPAGE D'UN LOCUS

L'efficacité ou le rendement d'un locus en termes de typage a été estimé par sa capacité à discriminer le plus grand nombre d'isolats, en calculant le nombre de génotypes décrits par polymorphisme. La contribution de chacun des loci a également été appréciée en examinant l'effet de l'exclusion de chaque locus sur le nombre de profils et le pouvoir discriminant.

STABILITE ET REPRODUCTIBILITE

La stabilité des marqueurs utilisés pour la méthode MLST a été évaluée en comparant le profil obtenu pour une souche donnée (ici, FSSC CBS 124896) entre une extraction issue d'une culture primaire et celle obtenue après 10 repiquages. En effet, les marqueurs ne doivent pas évoluer rapidement pour une souche donnée afin de pouvoir positionner celle-ci dans un contexte épidémiologique.

Pour déterminer la reproductibilité intra-laboratoire, c'est-à-dire la capacité de la technique à reproduire le même profil pour une souche donnée dans des conditions expérimentales différentes, l'ADN de trois isolats a été extrait à partir de trois cultures indépendantes et ensuite typés par la technique de MLST à des temps différents.

Analyse phylogénique

DETERMINATION DE L'ESPECE PHYLOGENETIQUE ET DE L'HAPLOTYPE

Une première analyse phylogénétique a consisté à positionner les souches du complexe d'espèces *Fusarium solani* étudiées dans la classification établie par O'Donnell pour déterminer leurs espèces phylogénétiques ou haplotypes [O'Donnell *et al.*, 2008](6). Cette analyse a fait intervenir 125 isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani* : 50 de cette étude et 75 issues des études de O'Donnell pour lesquelles les séquences nucléotidiques sont disponibles dans GenBank (Annexe 2) [O'Donnell *et al.*, 2008](6). Cette étape se base sur les trois gènes traditionnellement utilisés pour ce complexe d'espèces à savoir : EF1 α , ITS-nuLSU et RPB2. Les données ont été analysées en utilisant une approche de vraisemblance avec le logiciel RAxML VI-HPC [Stamatakis *et al.*, 2005, 2008](197)(198), mis à disposition sur le serveur web CIPRES (www.phylo.org). La recherche ML a suivi un modèle d'évolution moléculaire GTRMIX appliqué à huit partitions (EF1 α intron, 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} positions de codon; ITS-nuLSU, et RPB2 1^{er}, 2^{ème} et 3^{ème} positions du codon). Les valeurs de support ont été obtenues dans RAxML avec un bootstrap d'analyse de 1000 pseudo-réplicats. Pour la détermination des haplotypes, les 50 isolats ont été inclus dans un plus grand ensemble de données comprenant EF1 α , ITS-nuLSU et RPB2 pour un grand nombre d'isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani* (O'Donnell, y compris des données non publiées pour plusieurs isolats) et analysées en utilisant le logiciel Collapse version 1.2 (disponible à <http://crandalllab.byu.edu/>). Les valeurs par défaut des options ont été utilisées, sauf pour les données manquantes, qui ne sont pas comptées en tant que différences (option-m).

POUVOIR DE RESOLUTION

Une seconde analyse a porté sur les 50 souches du complexe d'espèces *Fusarium solani* incluses dans cette étude et consistait à comparer la résolution phylogénétique entre différents schémas de typage. Trois ensembles de gènes étaient comparés : un ensemble comprenant les trois régions des gènes traditionnellement utilisés pour ce complexe d'espèces (EF1 α , ITS-nuLSU, RPB2), un ensemble de cinq marqueurs nouvellement mis au point (FsACC, FsICL, FsGPD, FsMDP, FsSOD), et un dernier jeu, comprenant l'ensemble des huit loci précédemment cités. L'ensemble des données a également été analysé en utilisant RAxML, avec un modèle GTRMIX de l'évolution et plusieurs partitions correspondant aux trois positions de codons pour chaque gène codant une protéine, à leurs introns lorsqu'ils sont présents, et à ITS-nuLSU.

Les valeurs de support ont été obtenues grâce à RAxML avec une analyse de bootstrap de 1000 pseudo-réplicats. Le nombre de nœuds bien soutenus (valeur de bootstrap $\geq 70\%$) a été utilisé pour comparer le pouvoir de résolution de ces différents ensembles de gènes. *Fusarium staphyleae* NRRL 22316 a été utilisé comme groupe externe.

RESULTATS

Développement d'une méthode de MLST pour le complexe d'espèces *Fusarium solani*

SELECTION DES LOCI D'INTERET

L'amplification de chacun des 25 gènes initialement sélectionnés a été réalisée sur 5 isolats. Parmi eux, huit ont été amplifiés avec succès pour les souches du complexe d'espèces *Fusarium solani* et ensuite séquencés. Cinq présentaient une grande variabilité alors que les trois autres étaient peu variables. Se basant sur la plus haute discrimination inter-souches, les cinq loci les plus variables ont été sélectionnés pour construire le schéma de MLST : ACC, ICL, GPD, MPD et SOD qui codent respectivement pour acétylcoenzyme A carboxylase, isocitrate lyase, glycéraldéhyde 3P déshydrogénase, mannitol 1P déshydrogénase et superoxyde dismutase.

Les différents loci analysés et les motifs d'exclusion de ceux-ci du schéma de MLST sont consignés dans le tableau 7.

Tableau 7 : Origine des loci analysés et motifs d'exclusion / inclusion du schéma de MLST de FSSC

Locus	Nom	Utilisation dans le schéma MLST	MLST FSSC
ACC	AcetylCoA carboxylase	<i>Candida albicans</i> [Bougnoux <i>et al.</i> , 2002](186)	INCLUSION
ADP1	ATP dependant permease	<i>Candida albicans</i> [Bougnoux <i>et al.</i> , 2002](186)	EXCLUSION Amplification
ANX	Annexin	<i>Aspergillus fumigatus</i> [Bain <i>et al.</i> , 2007](193)	EXCLUSION Amplification
BGT1	Beta1,3 glucanosyltransférèse	<i>Aspergillus fumigatus</i> [Bain <i>et al.</i> , 2007](193)	EXCLUSION Amplification
CAT1	Catalase	<i>Aspergillus fumigatus</i> [Bain <i>et al.</i> , 2007](193)	EXCLUSION Amplification
GPD	Glyceraldehyde 3P deshydrogenase	<i>Cryptococcus neoformans</i> [Litvintseva <i>et al.</i> , 2006](191)	INCLUSION
HIS3	Imidazole glycerol P dehydratase	<i>Candida krusei</i> [Jacobsen <i>et al.</i> , 2007](189)	EXCLUSION Amplification
HMG	HydroxyMethylGlutaryl- CoA reductase	Aucun	EXCLUSION Variabilité
ICL	Isocitrate lyase	<i>Candida tropicalis</i> [Tavanti <i>et al.</i> , 2005](188)	INCLUSION
LAC1	Laccase	<i>Cryptococcus neoformans</i> [Litvintseva <i>et al.</i> , 2006](191)	EXCLUSION Amplification

PARTIE II

Typage Moléculaire de FSSC

LIP	Lipase	<i>Aspergillus fumigatus</i> [Bain <i>et al.</i> , 2007](193)	EXCLUSION Amplification
MAT1-2	Mating type protein	<i>Aspergillus fumigatus</i> [Bain <i>et al.</i> , 2007](193)	EXCLUSION Amplification
MPD	Mannitol 1P deshydrogenase	<i>Cryptococcus neoformans</i> [Litvintseva <i>et al.</i> , 2006](191)	INCLUSION
NMT1	Myristoyl CoA transferase	<i>Candida krusei</i> [Jacobsen <i>et al.</i> , 2007](189)	EXCLUSION Amplification
PLB1	Phospholipase	<i>Cryptococcus neoformans</i> [Litvintseva <i>et al.</i> , 2006](191)	EXCLUSION Amplification
RPN2	26S proteasome regulatory subunit	<i>Candida albicans</i> [Bougnoux <i>et al.</i> , 2002](186)	EXCLUSION Amplification
SOD	Superoxyde dismutase	<i>Cryptococcus neoformans</i> [Litvintseva <i>et al.</i> , 2006](191)	INCLUSION
SYA1c	Alanyl RNA synthetase	<i>Candida albicans</i> [Bougnoux <i>et al.</i> , 2002](186)	EXCLUSION Amplification
TOP1	Topoisomérase 1	<i>Cryptococcus neoformans</i> [Litvintseva <i>et al.</i> , 2006](191)	EXCLUSION Variabilité
UGP1	UTP glucose 1P uridylyltransférase	<i>Candida glabrata</i> [Dodgson <i>et al.</i> , 2003](187)	EXCLUSION Variabilité
URA3	Orotidine 5'P decarboxylase	<i>Candida glabrata</i> [Dodgson <i>et al.</i> , 2003](187)	EXCLUSION Amplification
URE1	Urease	<i>Cryptococcus neoformans</i> [Litvintseva <i>et al.</i> , 2006](191)	EXCLUSION Amplification

XYR1	D xylose reductase I ou II	<i>Candida tropicalis</i> [Tavanti <i>et al.</i> , 2005](188)	EXCLUSION Amplification
ZRF2	Zinc transporter	<i>Aspergillus fumigatus</i> [Bain <i>et al.</i> , 2007](193)	EXCLUSION Amplification
ZWF1 alpha	Putative G6PD	<i>Candida tropicalis</i> [Tavanti <i>et al.</i> , 2005](188)	EXCLUSION Amplification

« Amplification » signifie que le locus d'intérêt n'a pas pu être amplifié chez tous les isolats testés et « Variabilité » que les séquences nucléotidiques étaient trop peu variables pour réaliser une analyse des polymorphismes.

Pour chaque locus, la zone de début et de fin d'analyse de la séquence nucléotidique utilisée pour l'alignement multiple est décrite dans le tableau 8.

L'efficacité de typage de chaque locus a également été déterminée par le calcul du nombre de génotypes par polymorphisme pour la population test des 50 isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani* (tableau 8). FsSOD a montré la plus grande efficacité, en distinguant 14 génotypes pour 13 polymorphismes observés. FsICL est au contraire le marqueur le moins efficace avec 24 génotypes différenciés pour 67 polymorphismes observés.

Tableau 8 : Caractéristiques des 5 loci étudiés

Locus	Début	Fin	Taille (pb)	Nombres de polymorphismes	Nombre de génotypes	Nombre de génotypes / polymorphismes
FsACC	GTTGAC	GTACAT	371	54	23	0.43
FsICL	GCTCAG	GCATCC	369	67	24	0.36
FsGPD	ACCGTC	GTGACA	355	31	19	0.61
FsMPD	CACGTT	CCTACC	334	47	22	0.47
FsSOD	CAACGG	GTAAGA	187	13	14	1.08

VALIDATION DE LA METHODE DE MLST

Les séquences obtenues à partir des isolats issus de cultures primaires ou de la 10^{ème} sous-culture sont identiques, validant ainsi la stabilité de cette méthode.

La reproductibilité, qui a été testée en utilisant trois isolats distincts extraits et analysés à partir de trois cultures indépendantes, a également été validée en obtenant des séquences identiques.

POUVOIR DISCRIMINANT DE LA METHODE DE MLST

Quarante et un profils différents ont été déterminés par la technique de MLST développée parmi les 51 souches sélectionnées dans la population test. Les caractéristiques pour chacun des locus sont consignées dans le tableau 9.

Ces données ont permis de calculer, par la formule de Simpson, le pouvoir discriminant de ce schéma de MLST qui est de 0,991 avec un intervalle de confiance à 95 % de : [0,984; 0,997].

La figure 27 montre la relation entre la variation de l'indice de diversité et le nombre de gènes utilisés dans le schéma MLST. Selon nos résultats, le pouvoir discriminant augmente lorsque le nombre de gènes inclus dans le schéma augmente.

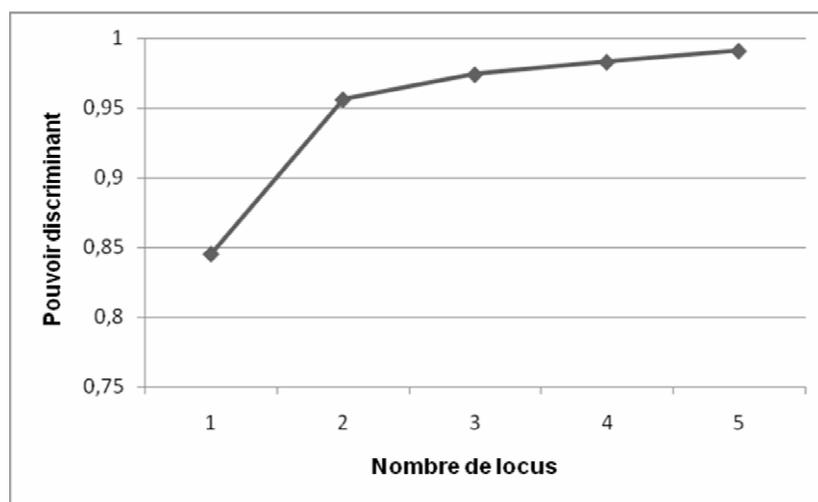


Figure 27 : Relation entre le pouvoir discriminant et le nombre de locus utilisés pour différencier des isolats de FSSC

Tableau 9 : Caractéristiques et géotypes des 51 isolats de FSSC de la population test étudiée pour le développement du schéma de MLST

Référence collection CBS	Localisation	Origine géographique	Locus					Profil (ST)
			ACC	ICL	GDP	MDP	SOD	
124633	Ongle	France (Nancy)	1	1	1	1	1	1
124894	Peau	France (Paris)	1	2	1	1	2	2
124632	Peau	France (Paris)	2	3	2	2	3	3
124901	Peau	France (Paris)	1	4	1	1	1	4
124631	Ongle	France (Paris)	3	5	3	3	4	5
124630	Peau	France (Paris)	2	3	2	2	3	3
124629	Ongle	France (Paris)	3	5	3	3	3	6
124895	Peau	France (Paris)	4	6	4	4	3	7
124896	Sang	Belgique	5	7	5	5	5	8

PARTIE II

Typage Moléculaire de FSSC

124628	Ongle	France (Paris)	3	5	3	3	5	9
124623	Environnement	France (Paris)	3	5	3	3	3	6
124889	Ongle	France (Paris)	1	8	1	1	1	10
124627	/	/	6	9	2	6	3	11
124890	Ongle	France (Nancy)	7	10	6	4	3	12
124897	Peau	Gabon	1	1	7	1	1	13
124891	Peau	Gabon	8	11	8	1	1	14
124898	Peau	Gabon	1	2	1	7	2	15
124892	Ongle	Gabon	9	12	9	8	3	16
124899	Ongle	Gabon	1	8	1	1	1	10
124893	Ongle	France (Limoges)	4	10	6	4	3	17
124900	Pied	France (Limoges)	4	10	6	4	3	17

PARTIE II

Typage Moléculaire de FSSC

124626	/	/	3	5	10	3	1	18
125013	/	France (Lille)	5	7	11	9	5	19
124625	Cornée	France (Lille)	3	5	3	3	6	20
124624	Ongle	France (Nancy)	3	5	3	3	3	6
102824	Fragment d'assiette	Colombie	10	13	3	10	7	21
241.93	Mycétome	Suriname	11	14	12	11	8	22
115695	/	/	12	5	3	12	9	23
208.29	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Allemagne	10	13	3	10	7	21
181.29	<i>Solanum tuberosum</i>	Allemagne	5	7	13	5	5	24
119996	<i>Daucus carota</i>	Hollande	4	10	4	4	3	25
119223	<i>Daucus carota</i>	Espagne	13	15	14	13	10	26
118931	<i>Solanum lycopersicum</i>	Royaume Uni	14	16	2	14	11	27

PARTIE II

Typage Moléculaire de FSSC

117481	<i>Liriodendron tulipifera</i>	USA	15	17	15	15	9	28
115659	<i>Potato cultivar Maritta</i>	Allemagne	16	18	14	16	10	29
165.87	<i>Solanum tuberosum</i>	Danmark	4	10	6	4	3	17
318.73	<i>Trichosanthes dioica</i>	Inde	17	19	16	17	3	30
222.49	<i>Euphorbia fulgens</i>	Hollande	18	16	2	7	11	31
231.31	<i>Quercus garyana</i>	USA	5	7	5	5	5	8
121450	Vigne	Syrie	6	20	17	6	12	32
115660	Pomme de terre	Egypte	19	21	14	18	10	33
115658	Pomme de terre	Israel	13	21	14	18	3	34
115045	<i>Calamus Palmae</i>	Hong Kong	20	5	3	19	13	35
166.87	Sol sous <i>Castanea</i>	USA	21	10	4	4	3	36
109028	Nodule sous cutané	Suisse	22	22	18	20	4	37

PARTIE II

Typage Moléculaire de FSSC

108942	Gros orteil	Hollande	4	10	4	4	3	25
490.63	Homme	Japon	1	8	1	1	2	38
224.34	Ongle gros orteil	Cuba	3	5	3	3	4	5
112100	Prothèse vocale	Belgique	4	6	4	21	3	39
117608	Lésion du bras	Turquie	23	23	19	22	14	40
116746	Cheveux	Ghana	6	24	2	22	14	41

Détermination de l'espèce phylogénétique et de l'haplotype des isolats de la population test

Une analyse phylogénétique a été réalisée afin de déterminer les haplotypes des isolats utilisés dans la population test pour le développement de la technique de MLST. Ces souches ont donc été séquencées selon le schéma de référence de O'Donnell faisant intervenir les loci EF1 α , ITS-nuLSU et RPB2 [O'Donnell *et al.*, 2008](6). Ensuite, elles ont été replacées dans l'arbre phylogénétique constitué selon O'Donnell, afin d'identifier les isolats selon la nomenclature actuelle du complexe d'espèces *Fusarium solani* (figure 28).

Cette analyse montre que toutes les souches du complexe d'espèces *Fusarium solani* utilisées dans cette étude appartiennent au clade 3 défini par Zhang [Zhang *et al.*, 2006](3). Elles sont nichées parmi 15 des 34 espèces phylogénétiques différentes. Environ la moitié des souches (24) représentent de nouveaux haplotypes (par exemple, CBS 241.93 33-b et CBS 231.31 11-k). L'autre moitié (26) comprend des souches avec des haplotypes génétiquement identiques à ceux précédemment échantillonnés par O'Donnell (par exemple, CBS 124629 1-d et CBS 117481 24-a.) Ainsi, deux ou plusieurs de nos souches sont incluses dans l'une des neuf espèces phylogénétiques précédemment définies (FSSC 1, 2, 3, 5, 6, 9, 11, 21, 25).

Typage Moléculaire de FSSC

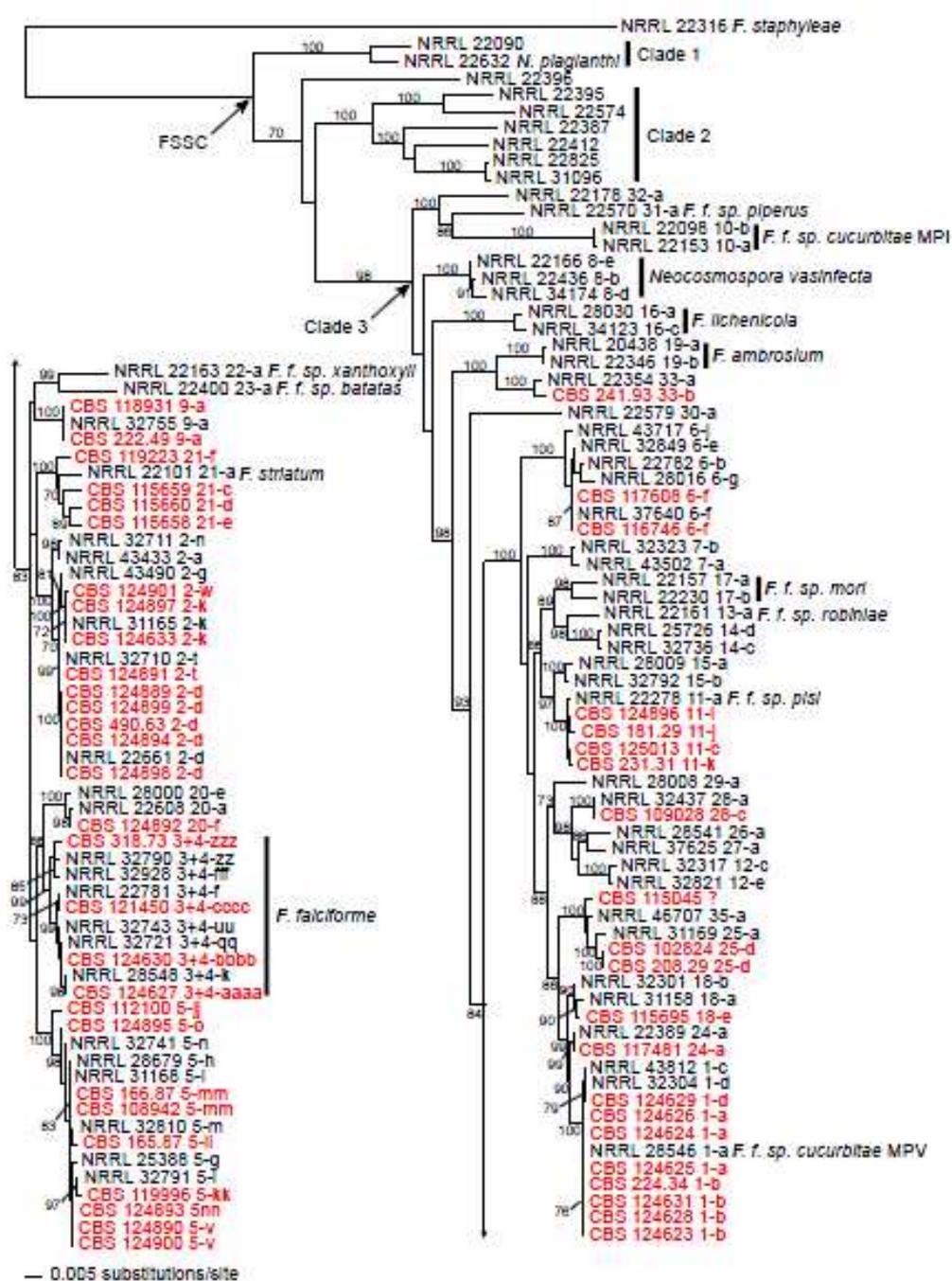


Figure 28 : Placement phylogénétique des 50 souches de FSSC typées dans cette étude (en rouge), parmi les espèces phylogénétiques de référence définies par O'Donnell [O'Donnell *et al.*, 2008](6)

Comparaison des deux techniques de typage moléculaire

Après avoir développé un schéma de MLST discriminant basé sur cinq gènes de ménages, celui-ci a été comparé à la technique de typage utilisée en phylogénie basée sur l'analyse de EF1 α , ITS-nuLSU et RPB2 [O'Donnell *et al.*, 2008](6). Ces deux méthodes ont donc été réalisées sur une population de 50 isolats et comparées entre elles, selon différentes modalités.

COMPARAISON DE LA RESOLUTION PHYLOGENIQUE

Les arbres phylogéniques obtenus à partir des deux méthodes de typage sont présentés respectivement dans les figures 29 et 30.

Ces deux analyses phylogéniques non racinées présentent des nœuds supportés par des valeurs de bootstrap $\geq 70\%$. L'analyse combinée des nouveaux marqueurs (ACC, ICL, GDP, MDP et SOD) en figure 29 montre 26 nœuds avec une valeur de bootstrap $\geq 70\%$. L'analyse des gènes traditionnellement utilisés pour le complexe d'espèces *Fusarium solani* (EF1 α , ITS-nuLSU, RPB2) en figure 30 présente 31 nœuds bien soutenus.

Typage Moléculaire de FSSC

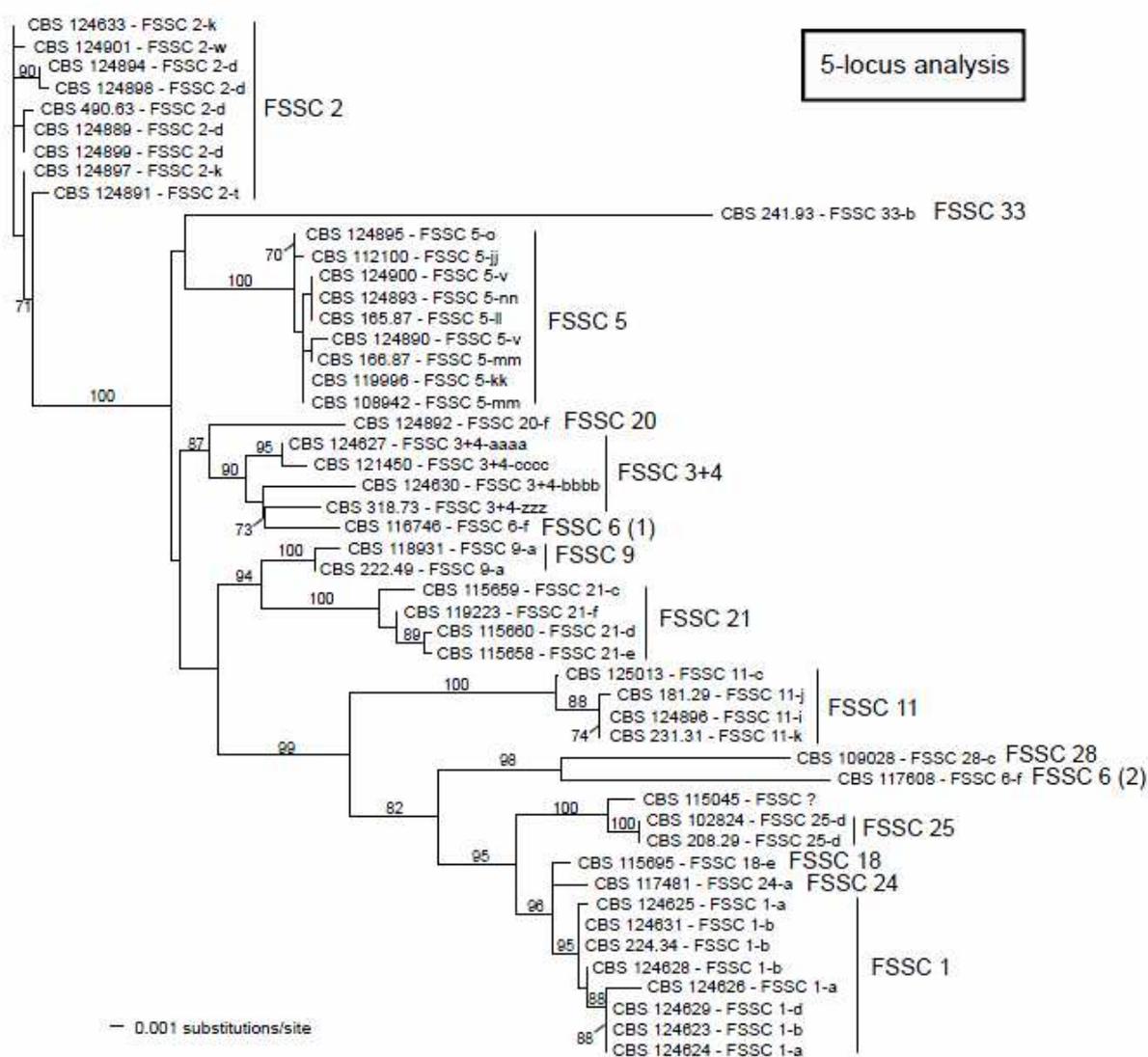


Figure 29 : Arbre phylogénique obtenu grâce à l'analyse des 5 nouveaux marqueurs (ACC, ICL, GDP, MDP, SOD)

Typage Moléculaire de FSSC

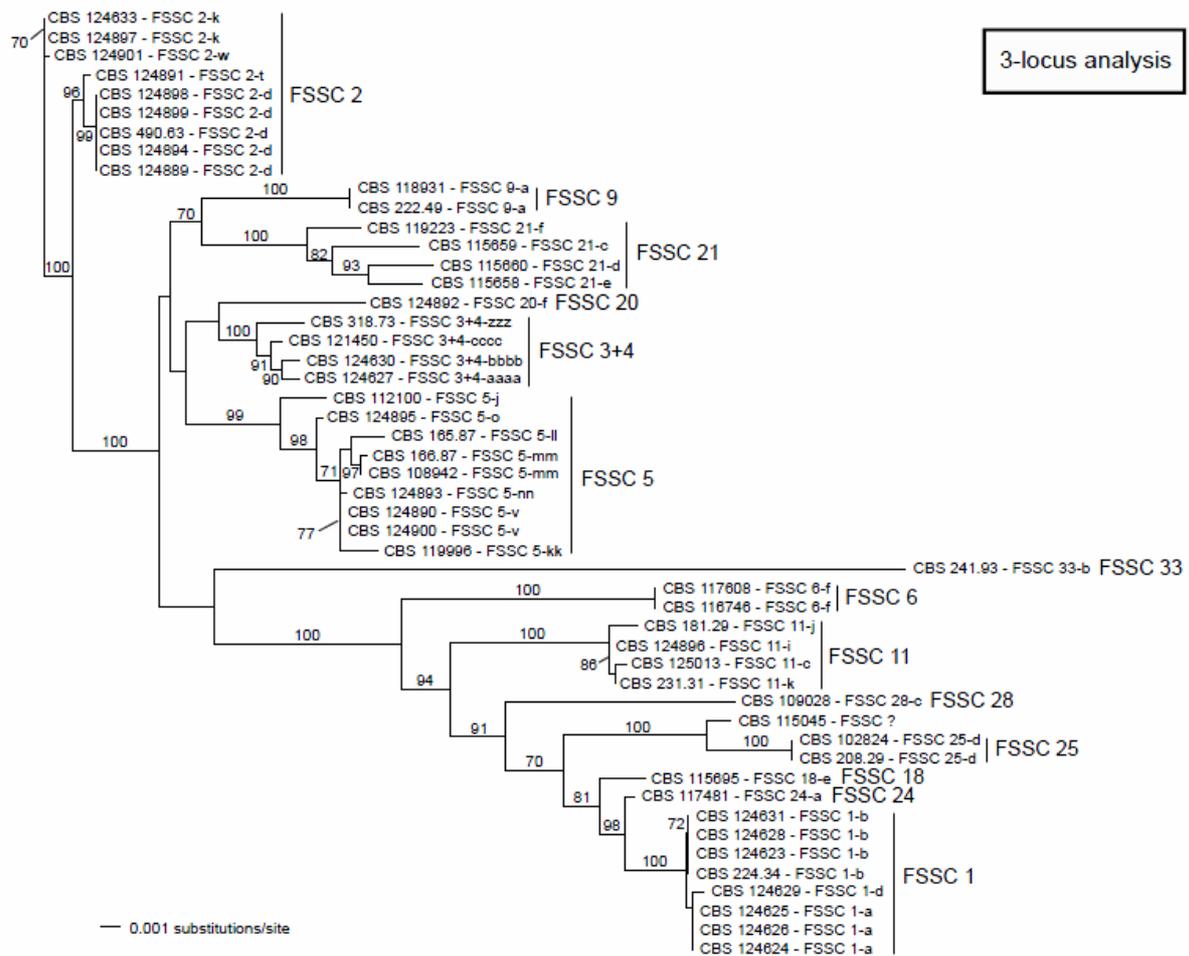


Figure 30 : Arbre phylogénique obtenu grâce à l'analyse des 3 gènes traditionnellement utilisés pour FSSC (EF1 α , ITS-nuLSU, RPB2)

COMPARAISON DU POUVOIR DISCRIMINANT

Les profils obtenus par les deux techniques sont synthétisés dans le tableau 10.

Parmi les 50 souches du complexe d'espèces *Fusarium solani*, 37 haplotypes différents ont été mis en évidence par le système à trois loci de O'Donnell [O'Donnell *et al.*, 2008](6). Le pouvoir discriminant de cette technique taxonomique est de 0,980. En utilisant le même échantillonnage, 41 haplotypes ont été distingués avec le schéma à cinq loci développé précédemment et cette méthode est caractérisée par un pouvoir discriminant de 0,991.

Plusieurs isolats, qui partageaient le même profil avec le système à trois loci [O'Donnell *et al.*, 2008](6) ont été différenciés par le schéma à cinq loci (tableau 9) et *vis versa*. Par exemple, les souches CBS224.34, CBS124631 et CBS124628 présentent le même profil (ST 4) avec le système à trois loci alors qu'ils correspondent à trois types de profils différents (ST 5, 9 et 6) avec le schéma à cinq loci. En revanche, les souches CBS124629, CBS124623 et CBS124624 présentent trois types de profils (ST 6, 4 et 14, respectivement) avec le système à trois loci, mais partagent le même profil (ST 6) avec le système à cinq gènes.

Tableau 10 : Caractéristiques moléculaires des 50 isolats typés en fonction de la technique utilisée

Identification CBS Espèce/haplotype	Schéma développé dans cette étude						Schéma de O'Donnell				Schéma de consensus
	<i>ACC</i>	<i>ICL</i>	<i>GDP</i>	<i>MDP</i>	<i>SOD</i>	<i>ST</i>	<i>EF1a</i>	<i>ITS- nuLSU</i>	<i>RPB2</i>	<i>ST</i>	<i>ST</i>
CBS 124633 - FSSC 2-k	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CBS 124894 - FSSC 2-d	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2
CBS 124901 - FSSC 2-w	1	4	1	1	1	4	1	1	2	3	3
CBS 124631 - FSSC 1-b	3	5	3	3	4	5	3	2	3	4	4
CBS 124630 - FSSC 3+4- bbbb	2	3	2	2	3	3	4	3	4	5	5
CBS 124629 - FSSC 1-d	3	5	3	3	3	6	5	4	3	6	6
CBS 124895 - FSSC 5-o	4	6	4	4	3	7	6	5	5	7	7
CBS 124896 - FSSC 11-i	5	7	5	5	5	8	7	6	6	8	8
CBS 124628 - FSSC 1-b	3	5	3	3	5	9	3	2	3	4	9
CBS 124623 - FSSC 1-b	3	5	3	3	3	6	3	2	3	4	10
CBS 124889 - FSSC 2-d	1	8	1	1	1	10	2	1	1	2	11
CBS 124627 - FSSC 3+4- aaaa	6	9	2	6	3	11	32	3	7	9	12
CBS 124890 - FSSC 5-v	7	10	6	4	3	12	8	5	8	10	13
CBS 124897 - FSSC 2-k	1	1	7	1	1	13	1	1	1	1	14
CBS 124891 - FSSC 2-t	8	11	8	1	1	14	9	1	1	11	15
CBS 124898 - FSSC 2-d	1	2	1	7	2	15	2	1	1	2	16
CBS 124892 - FSSC 20-f	9	12	9	8	3	16	10	9	9	12	17
CBS 124899 - FSSC 2-d	1	8	1	1	1	10	2	1	1	2	11

PARTIE II

Typage Moléculaire de FSSC

CBS 124893 - FSSC 5-nn	4	10	6	4	3	17	11	5	8	13	18
CBS 124900 - FSSC 5-v	4	10	6	4	3	17	8	5	8	10	19
CBS 124626 - FSSC 1-a	3	5	10	3	1	18	3	4	3	14	20
CBS 125013 - FSSC 11-c	5	7	11	9	5	19	12	10	6	15	21
CBS 124625 - FSSC 1-a	3	5	3	3	6	20	3	4	3	14	22
CBS 124624 - FSSC 1-a	3	5	3	3	3	6	3	4	3	14	23
CBS 102824 - FSSC 25-d	10	13	3	10	7	21	13	11	10	16	24
CBS 241.93 - FSSC 33-b	11	14	12	11	8	22	14	12	11	17	25
CBS 115695 - FSSC 18-e	12	5	3	12	9	23	15	13	12	18	26
CBS 208.29 - FSSC 25-d	10	13	3	10	7	21	13	11	10	16	24
CBS 181.29 - FSSC 11-j	5	7	13	5	5	24	17	14	13	20	27
CBS 119996 - FSSC 5-kk	4	10	4	4	3	25	18	15	14	21	28
CBS 119223 - FSSC 21-f	13	15	14	13	10	26	19	16	15	22	29
CBS 118931 - FSSC 9-a	14	16	2	14	11	27	20	17	16	23	30
CBS 117481 - FSSC 24-a	15	17	15	15	9	28	21	18	17	24	31
CBS 115659 - FSSC 21-c	16	18	14	16	10	29	19	19	18	25	32
CBS 165.87 - FSSC 5-ll	4	10	6	4	3	17	22	5	19	26	33
CBS 318.73 - FSSC 3+4-zzz	17	19	16	17	3	30	23	3	20	27	34
CBS 222.49 - FSSC 9-a	18	16	2	7	11	31	20	17	16	23	35
CBS 231.31 - FSSC 11-k	5	7	5	5	5	8	7	10	6	28	36
CBS 121450 - FSSC 3+4- cccc	6	20	17	6	12	32	24	3	21	29	37
CBS 115660 - FSSC 21-d	19	21	14	18	10	33	25	20	22	30	38
CBS 115658 - FSSC 21-e	13	21	14	18	3	34	26	21	23	31	39

PARTIE II

Typage Moléculaire de FSSC

CBS 115045 - FSSC ?	20	5	3	19	13	35	27	11	24	32	40
CBS 166.87 - FSSC 5-mm	21	10	4	4	3	36	28	5	8	33	41
CBS 109028 - FSSC 28-c	22	22	18	20	4	37	29	7	25	34	42
CBS 108942 - FSSC 5-mm	4	10	4	4	3	25	30	5	8	35	43
CBS 490.63 - FSSC 2-d	1	8	1	1	2	38	2	1	1	2	44
CBS 224.34 - FSSC 1-b	3	5	3	3	4	5	3	2	3	4	4
CBS 112100 - FSSC 5-jj	4	6	4	21	3	39	6	5	26	36	45
CBS 117608 - FSSC 6-f	23	23	19	22	14	40	31	8	27	37	46
CBS 116746 - FSSC 6-f	6	24	2	22	14	41	31	8	27	37	47

PROPOSITION D'UNE METHODE CONSENSUS

Après comparaison des deux techniques de typage décrites dans la littérature pour le complexe d'espèces *Fusarium solani*, nous avons cherché à optimiser chacune des techniques en proposant une méthode consensus.

Chacun des huit loci a été évalué en terme d'efficacité c'est-à-dire en fonction de sa capacité à distinguer le plus grand nombre d'isolats, en calculant le nombre de génotypes décrits par polymorphisme (tableau 11). Le locus RPB2 montre l'efficacité la plus faible (0,12 génotype par polymorphisme). L'efficacité des autres loci varie de 0,23 à 1,08.

Tableau 11 : Caractéristiques des 5 loci étudiés

Locus	Début	Fin	Taille (pb)	Nombres de polymorphismes	Nombre de génotypes	Nombre de génotypes / polymorphismes
FsACC	GTTGAC	GTACAT	371	54	23	0.43
FsICL	GCTCAG	GCATCC	369	67	24	0.36
FsGPD	ACCGTC	GTGACA	355	31	19	0.61
FsMPD	CACGTT	CCTACC	334	47	22	0.47
FsSOD	CAACGG	GTAAGA	187	13	14	1.08
EF1 α	TCGTCG	ACCGTG	716	133	31	0.23
ITS-nuLSU	CCGAGT	TGTTAT	986	71	21	0.30
RPB2	TACACC	GTTCTT	1738	221	27	0.12

La contribution de chaque locus au nouveau schéma consensus faisant intervenir les 8 loci étudiés a été déterminée en calculant la variation du nombre de profils détectés et le pouvoir discriminant du schéma de typage lorsque le locus testé a été exclu (tableau 12). La faible

contribution de RPB2 au schéma de typage est confirmée puisque le nombre de profils (47) et le pouvoir discriminant (0,998) ne varie pas lorsque RPB2 est retiré du schéma consensus, alors que ces deux valeurs diminuent lorsque l'un des quelconque autres loci est éliminé.

Tableau 12 : Contribution de chaque locus au schéma consensus à 8 loci

Schéma consensus	Nombre de profil	Pouvoir discriminant
Sans FsACC	46	0.997
Sans FsICL	46	0.997
Sans FsGPD	46	0.997
Sans FsMPD	45	0.995
Sans FsSOD	43	0.991
Sans EF1 α	45	0.996
Sans ITS-nuLSU	45	0.996
Sans RPB2	47	0.998
8 loci inclus	47	0.998

Un arbre phylogénique non raciné a été dessiné pour ce schéma de typage consensus faisant intervenir les 8 loci étudiés et il présente 30 nœuds supportés par des valeurs de bootstrap \geq 70 % (figure 31).

Typage Moléculaire de FSSC

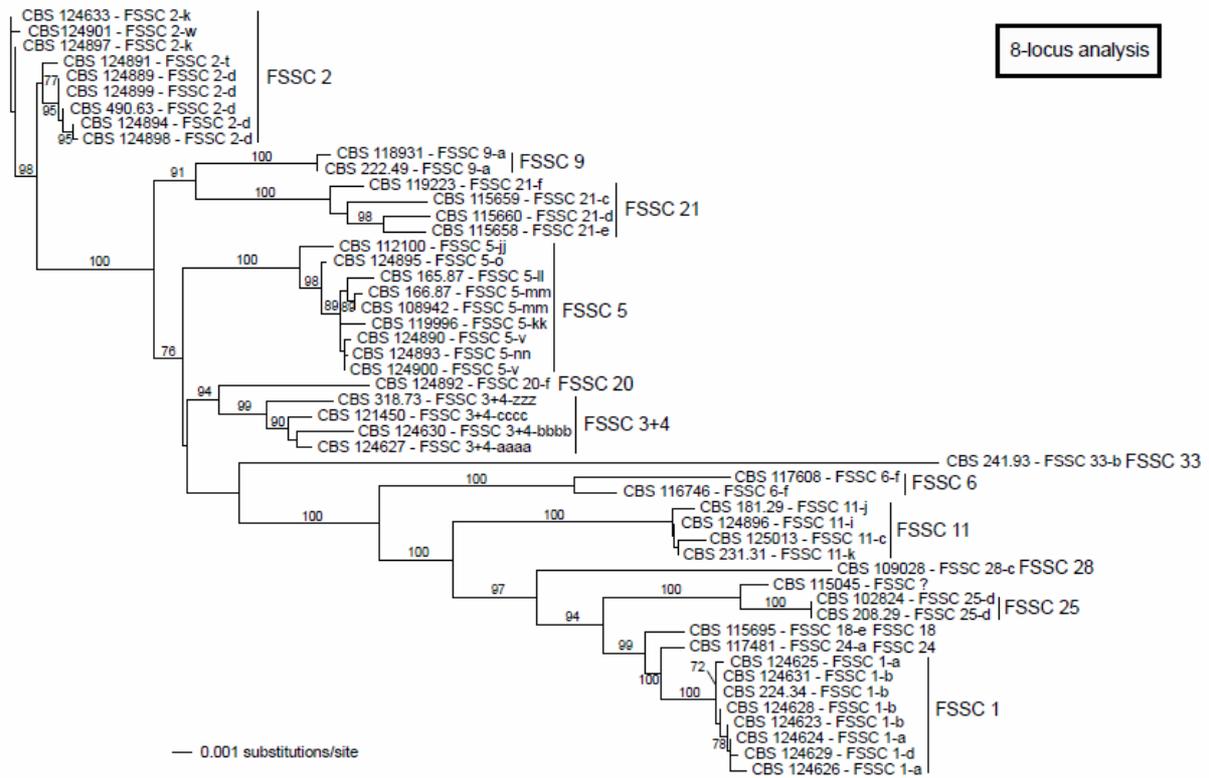


Figure 31 : Arbre phylogénique obtenu grâce à l'analyse par le schéma consensus à 8 loci

Comparaison des caractéristiques moléculaires de souches cliniques et végétales du complexe d'espèces *Fusarium solani*

Dans la population test utilisée, les isolats étaient d'origine clinique ou végétale (tableau 4). Le site d'isolement de la souche a été reporté sur l'arbre phylogénétique obtenu suite à l'analyse menée avec le schéma consensus (figure 32). Malgré la faible population de souches étudiées, la répartition est aléatoire en fonction des différents haplotypes à l'exception de FSSC 2 qui est composé exclusivement de souches cliniques et FSSC 21 d'isolats issus de plantes.

Typage Moléculaire de FSSC

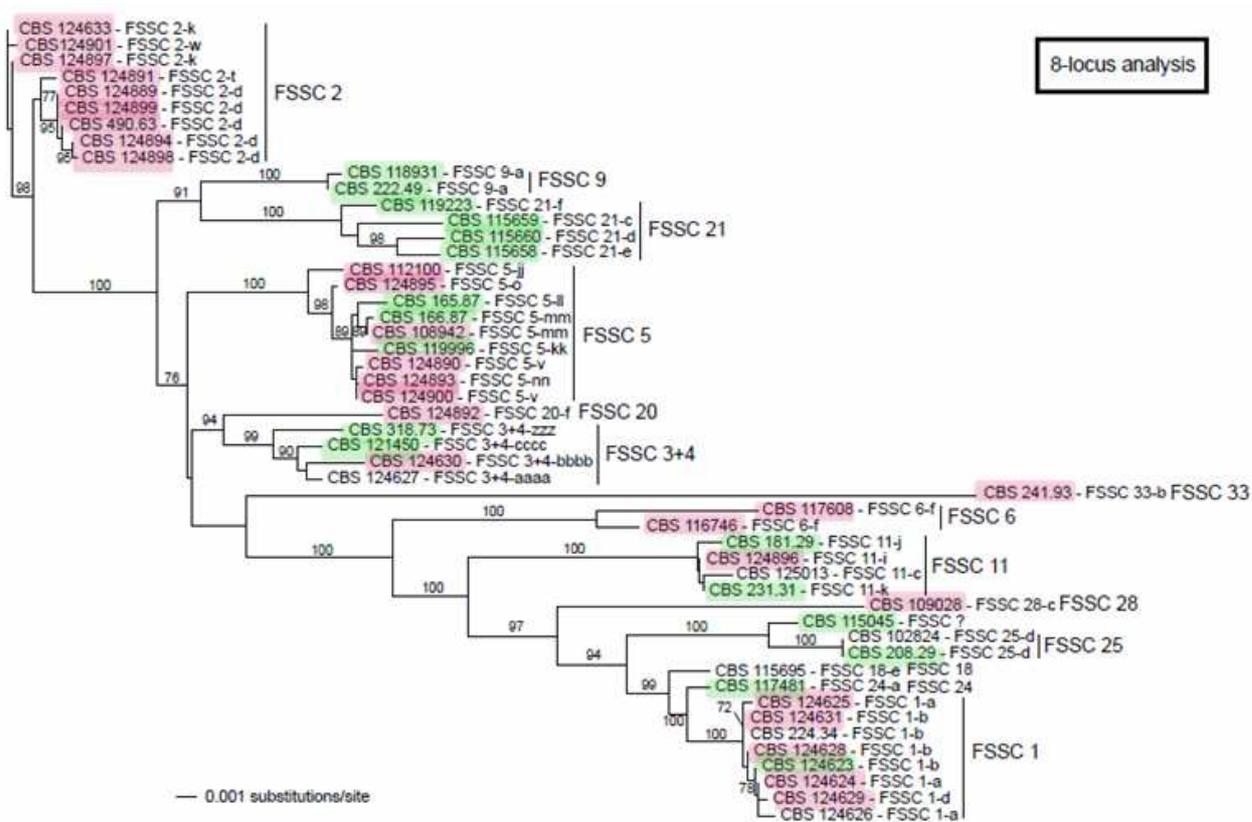


Figure 32 : Arbre phylogénique obtenu grâce à l'analyse par le schéma consensus à 8 loci en distinguant les souches cliniques (en rose) des souches végétales (en vert)

DISCUSSION

Les méthodes de typage contribuent grandement à la compréhension de l'épidémiologie des infections et de l'évolution des agents pathogènes. Elles sont donc importantes pour surveiller les foyers de maladies infectieuses. Deux prédominent en raison de leur haut niveau de standardisation : microsattellites et MLST. Parmi elles, la MLST s'est déjà avérée comme très résolutive en épidémiologie et dans les analyses de populations de plusieurs champignons [Meyer *et al.*, 2009](192).

Cette technique est basée sur l'identification de polymorphismes nucléotidiques pour plusieurs régions de gènes présentes chez tous les isolats au sein d'une espèce donnée. Cette méthode reproductible rend des résultats faciles à mettre en ligne par l'intermédiaire de bases de données. Cela permet des comparaisons rapides d'un grand nombre d'isolats et des échanges entre les différents laboratoires.

Dans cette étude, nous avons évalué l'apport de 25 gènes précédemment utilisés dans d'autres schémas de MLST pour des espèces fongiques à des fins épidémiologiques. Au final, cinq gènes ont été sélectionnés pour le développement d'une technique MLST permettant la différenciation d'isolats appartenant au complexe d'espèces *Fusarium solani*. Le schéma de MLST a été validé selon des recommandations publiées sur l'évaluation des méthodes de typage moléculaire [Van Belkum *et al.*, 2007](183). La technique est caractérisée par un pouvoir discriminant de 0,991 avec un intervalle de confiance à 95 % de [0,984; 0,997] et est donc considérée comme un outil fiable pour le typage des souches du complexe d'espèces *Fusarium solani*. En effet, selon le calcul de l'indice de Simpson, cette méthode serait suffisamment discriminante (0,95) en utilisant seulement deux gènes comme l'illustre la figure 27. Néanmoins, avec cinq gènes, le pouvoir discriminant est plus élevé, et permet ainsi la discrimination d'isolats qui auraient eu autrement le même profil. Cette méthode, basée sur l'analyse de 1616 nucléotides, est stable, reproductible, capable de faire la distinction entre des souches étroitement apparentées et donc fiable pour le typage des souches du complexe d'espèces *Fusarium solani*. En outre, la petite taille des fragments rend la technique particulièrement rentable et adaptée à des institutions non spécialisées avec de simples

installations de séquençage, par rapport à d'autres méthodes. Ce schéma constitue donc une nouvelle alternative, qui pourrait alors être utilisé en cas d'apparition de cas groupés de fusariose afin de mettre en évidence des relations entre les isolats cliniques et les souches environnementales. Par exemple, dans notre étude, avec la technique de MLST développée ici, certains isolats partagent le même génotype, comme par exemple, CBS 124630 et CBS 124632 qui ont été isolés à partir de patients différents dans le même hôpital, suggérant une origine commune possible liée à une infection nosocomiale.

La population test utilisée dans ce travail de développement d'une technique de typage moléculaire est composée d'isolats épidémiologiquement distincts mais est également représentative du complexe d'espèces *Fusarium solani*. En effet, l'haplotype de chacun des isolats a été déterminé selon la nomenclature décrite par O'Donnell [O'Donnell *et al*, 2008](6) (figure 28). Toutes les souches appartiennent au clade 3 défini par Zhang [Zhang *et al*, 2006](3). Il n'est pas surprenant de ne pas avoir d'isolats appartenant aux clades 1 et 2 car ils présentent une distribution géographique très limitée et sont isolés exclusivement de plantes malades ou mortes [Zhang *et al*, 2006](3). Les isolats disponibles dans cette étude se répartissent parmi 15 des 34 espèces phylogénétiques différentes, assurant ainsi une bonne représentativité de la diversité du complexe d'espèces *Fusarium solani*. De plus, la moitié des isolats représentent de nouveaux haplotypes non explorés dans les précédentes études sur le complexe d'espèces *Fusarium solani*.

La méthode de référence utilisée pour différencier des espèces phylogénétiques et des haplotypes au sein du complexe d'espèces *Fusarium solani* se base sur un ensemble de trois régions de gènes (EF1 α , ITS-nuLSU, RPB2) [O'Donnell *et al*, 2008](6). Cependant, un nouveau schéma de MLST a été proposé dans ce travail pour ce même complexe d'espèces. Dans ce dernier schéma, nous avons utilisé cinq gènes de ménage fréquemment utilisés dans les systèmes de MLST fongiques.

Ces deux schémas de typage basés sur des cibles moléculaires différentes ont été comparés et, selon les critères de Struelens [Struelens, 1996](196), ce sont toutes deux des méthodes de typage efficaces avec un indice de Simpson supérieur à 0,95. La comparaison des deux

systèmes *via* leur pouvoir discriminant, le nombre de profils détectés et leur résolution phylogénétique met en évidence leur complémentarité, et a suggéré que les loci les plus discriminants de chaque système pourraient être combinés pour obtenir un schéma consensus optimisé. La contribution de chaque locus au schéma consensus a été testée : SOD est le locus le plus efficace pour cette technique tandis que l'exclusion de RPB2 ne change pas le nombre de profils et le pouvoir discriminant pour la population testée. La combinaison basée sur huit loci EF1 α , ITS-nuLSU, RPB2, ACC, ICL, GPD, MPD et SOD a montré que 47 des 50 souches du complexe d'espèces *Fusarium solani* pouvaient être distinguées en utilisant ce schéma consensus, avec un pouvoir discriminant de 0,998. Cette méthode est donc plus discriminante que les schémas à trois ou cinq loci, qui différencient respectivement 37 et 41 haplotypes.

Bien que le schéma de MLST nouvellement développé avec les cinq loci montre une puissance légèrement plus discriminante que la technique avec les trois autres marqueurs, l'utilisation de celui-ci demeure cruciale pour différentes fins. Un objectif fondamental est d'identifier avec précision une espèce ou un complexe d'espèces, en particulier pour les champignons qui sont difficiles à identifier à partir d'observations microscopiques [Balajee *et al.*, 2009](139). Dans ce contexte, le besoin s'oriente vers des marqueurs disposant de vastes bases de données de séquences, déjà disponibles en ligne. Pour le complexe d'espèces *Fusarium solani*, ces marqueurs sont EF1 α et RPB2, qui sont disponibles dans Fusarium-ID (www.isolate.fusariumdb.org) et dans les bases de données MLST de *Fusarium* ([www.cbs.knaw.nl / fusarium / BioloMICS.aspx](http://www.cbs.knaw.nl/fusarium/BioloMICS.aspx)). Un autre objectif est d'analyser les relations phylogénétiques entre les souches dans le but d'apprécier l'évolution de l'espèce considérée. A cet effet, les marqueurs moléculaires ont besoin de fournir une résolution phylogénétique bien supportée. Pour le complexe d'espèces *Fusarium solani*, RPB2, EF1 α et ITS-nuLSU sont à ce jour les meilleurs marqueurs phylogénétiques disponibles.

La MLST, développée à l'origine pour les bactéries, se base sur l'analyse des polymorphismes nucléotidiques situés typiquement sur cinq à dix gènes de ménage [Meyer *et al.*, 2009](192). Bien que l'utilisation du plus grand nombre de loci possible permet d'améliorer le pouvoir discriminant de la technique, il semble pragmatique d'atteindre un niveau maximal de différenciation avec un jeu minimal de gènes cibles. Même si nous avons découvert que RPB2 ne contribue pas de manière significative au schéma consensus, il a été utilisé dans le passé

pour établir le système de nomenclature par haplotype en cours d'utilisation et est donc néanmoins essentiel à la technique consensus. Avec huit loci, ce système offre une puissance élevée de discrimination et reste facile à mettre en œuvre, particulièrement actuellement où l'amplification par PCR et le séquençage sont largement accessibles dans la plupart des laboratoires.

De ce fait, une application de cette nouvelle technique de typage a été de comparer les caractéristiques moléculaires des isolats d'origine végétale et clinique. La répartition des deux catégories de souches sont polyphylétiques, ce qui a déjà été décrit dans le cas des isolats humains [Zhang *et al.*, 2006](3). Dans notre population, les haplotypes FSSC 2 et FSSC 21 sont composés exclusivement de souches cliniques pour l'un et d'isolats issus de plantes pour l'autre. Cependant, il s'agit vraisemblablement d'un biais dû au faible effectif de notre population puisque dans la littérature ces deux haplotypes contiennent des souches de deux origines [Zhang *et al.*, 2006](3) [O'Donnell *et al.*, 2008](6). En revanche, selon ces derniers auteurs, FSSC 5 contient uniquement des souches d'origine humaine alors que dans notre cas, des isolats végétaux y sont également retrouvés.

Ainsi, au sein du clade 3 du complexe d'espèces *Fusarium solani*, la distribution des souches cliniques et végétales dans les différents haplotypes est comparable. Cette donnée permet de soulever l'hypothèse d'une contamination d'origine environnementale dans les cas de fusarioses humaines et justifie la nécessité de disposer d'une méthode de typage moléculaire très discriminante telle que le schéma de MLST à 8 loci proposé dans ce travail.

PARTIE III

EXPLORATION DE LA RESISTANCE

DU COMPLEXE D'ESPECES

FUSARIUM SOLANI

AU VORICONAZOLE

Article 3 :

Eur J Clin Microbiol Infect Dis (2012) 31:615–618
DOI 10.1007/s10096-011-1323-x

LETTER TO THE EDITOR

Amphotericin B and voriconazole susceptibility profiles for the *Fusarium solani* species complex: comparison between the E-test and CLSI M38-A2 microdilution methodology

A. Debourgogne · S. de Hoog · A. Lozniewski · M. Machouart

CONTEXTE SCIENTIFIQUE

Le genre *Fusarium* est résistant *in vitro* à la plupart des molécules antifongiques disponibles en pathologie humaine. De plus, le complexe d'espèces *Fusarium solani* est considéré comme le moins sensible au sein de ce genre fongique [Cuenca-Estrella *et al.*, 2006](153). Même si actuellement, de fortes doses d'amphotéricine B, combinées ou non au voriconazole sont recommandées ainsi que la réduction des facteurs d'immunodépression [Nucci et Anaissie, 2007](11), la conduite thérapeutique à suivre vis-à-vis d'une fusariose invasive fait encore débat : certains praticiens hésitent à prescrire une monothérapie ou une bithérapie et à l'associer ou non à la chirurgie ou l'utilisation de facteurs de croissance de la lignée myéloïde.

Bien que la multirésistance de ce complexe d'espèces soit reconnue par tous, une seule étude décrit un mécanisme de résistance. En effet, l'équipe de Ha a établi que la résistance à la caspofungine du complexe d'espèces *Fusarium solani* fait intervenir une modification de la cible, la bêta 1,3 glucane synthase (FKS1) [Ha *et al.*, 2006](199).

Les champignons du genre *Fusarium* sont responsables de pathologies humaines mais sont également phytopathogènes. De ce fait, quelques travaux explorent le mécanisme de résistance du complexe d'espèces *Fusarium graminearum* à un antifongique de la famille des azolés utilisés en agriculture, le tébuconazole [Becher *et al.*, 2010](200) [Becher *et al.*, 2011](201) [Liu *et al.*, 2010](202) [Liu *et al.*, 2011](203).

Cependant, aucune donnée n'est disponible à ce jour pour expliquer la faible sensibilité de *Fusarium* au voriconazole, bien que différents mécanismes soient décrits pour d'autres genres tels que *Candida* ou *Aspergillus*.

En effet, le mécanisme de résistance le plus fréquent chez *Aspergillus fumigatus* est la mutation du gène CYP51 codant pour la 14 alpha stérol déméthylase. Les antifongiques azolés inhibent cette enzyme, conduisant au blocage de la biosynthèse de l'ergostérol et par conséquent à une déplétion en ergostérol et à une accumulation de métabolites toxiques. Le génome d'*Aspergillus fumigatus* contient deux gènes distincts mais relativement proches de

CYP51 (ou ERG 11 chez les levures) : CYP51A et CYP51B, chacun codant pour des protéines différentes alors que *Fusarium solani* en possède trois (A, B et C). De rares mutations ont été détectées sur le gène CYP51B d'*Aspergillus fumigatus* mais n'ont jamais été associées à une résistance aux azolés. En revanche, certaines régions de mutations non silencieuses sur le gène CYP51A (par exemple, au niveau des codons G54, G138 et M220) correspondent à une résistance aux azolés. D'autres modifications consistent en la présence de zones répétées en tandem de 34, 46 ou 53 paires de bases au niveau de la région promotrice du gène CYP51A (généralement combinées à d'autres mutations sur le gène lui-même), entraînant une augmentation de l'expression du gène CYP51A. Comme dans le cas d'*Aspergillus fumigatus*, la résistance aux azolés chez d'autres champignons tels que ceux appartenant au genre *Candida* peut être causée par une altération ou une surexpression de la 14 alpha déméthylase [Camps *et al.*, 2012](204).

De plus, la surexpression de plusieurs types de canaux d'efflux, qui éliminent les substances azolées toxiques en dehors de la cellule a été impliquée dans la résistance de *Candida* sp. Quant à *Aspergillus fumigatus*, ce champignon contient plusieurs types de pompes à efflux de la famille ABC (ATP binding cassette) ou MFS (Major Facilitator Superfamily). Cependant, le rôle direct de ces transporteurs dans la résistance aux azolés n'a pas encore été complètement établi dans le cas des champignons filamenteux [Camps *et al.*, 2012](204).

OBJECTIFS

Cette étude porte dans un premier temps sur l'évaluation de l'activité *in vitro* de l'amphotéricine B et du voriconazole, les molécules les plus utilisées en pratique clinique, vis-à-vis d'un panel d'isolats cliniques et environnementaux du complexe d'espèces *Fusarium solani*, précédemment étudié en phylogénie. En complément, deux méthodes testant la sensibilité aux antifongiques ont été comparées : la méthode CLSI M38-A2, considérée comme référence, et la technique E-test utilisée au quotidien en pratique de laboratoire.

Dans un second temps, les deux principaux mécanismes de résistance aux antifongiques de la famille des azolés ont été explorés d'une manière générale : la recherche d'un phénomène d'efflux ainsi qu'une modification de la cible du voriconazole, la 14 alpha stérol déméthylase.

MATERIELS & METHODES

Détermination des CMI du complexe d'espèces *Fusarium solani* au voriconazole et à l'amphotéricine B

SOUCHES ETUDIEES

Quarante huit isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani* et précédemment étudiés pour leurs profils moléculaires, ont été inclus dans cette analyse. Ces souches avaient pour origine soit une lésion chez un patient, soit une plante ou l'environnement.

La souche de référence *Fusarium solani* ATCC MYA3636 a servi de contrôle de qualité pour la détermination des Concentrations Minimales Inhibitrices par les techniques CLSI et E-test.

MOLECULES ANTIFONGIQUES

Des bandelettes E-test (Biomérieux, Marcy l'Etoile, France) de voriconazole et d'amphotéricine B ont été utilisées. Elles ont été conservées à -20°C jusqu'à la réalisation du test. Le gradient de concentrations pour chaque molécule antifongique varie de 0,004 à 32 $\mu\text{g/mL}$.

Les solutions mères d'antifongiques ont été préparées à partir d'échantillons de poudre d'amphotéricine B (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) et de voriconazole (Pfizer, Groton, CT, USA) dissoutes dans du diméthylsulphoxide et conservées à -20°C , selon le protocole CLSI M38-A2 (205). Ces solutions ont ensuite été diluées dans du milieu

RPMI 1640 pour obtenir deux fois la concentration finale requise pour le test (s'étendant sur une gamme de 0.03 à 16 µg/mL).

PREPARATION DE L'INOCULUM

L'inoculum est préparé à partir d'une culture de 7 jours sur milieu PDA (potato dextrose agar) avec une première incubation de 72 h à 35°C suivie d'une seconde à 25°C pendant 96 h. La taille de l'inoculum est ajustée à partir d'une suspension de conidies à l'aide d'un spectrophotomètre pour obtenir une densité optique comprise entre 0.15 et 0.17 à une longueur d'onde de 530 nm, ce qui correspond à une concentration de conidies comprise entre 0,4 et 5×10^4 unités formant colonies / mL. La concentration finale de la suspension est ensuite vérifiée par comptage des colonies sur milieu de Sabouraud [CLSI M38-A2](205).

L'inoculum ainsi préparé est dilué au 1/50^{ème} dans une solution de NaCl avant d'être utilisé pour la détermination des CMI par la technique CLSI M38-A2.

METHODE EN MICRODILUTION CLSI M38-A2

Pour cette technique d'évaluation de la sensibilité aux antifongiques, réalisée en microdilution, 100 µL de la suspension de conidies diluée ont été inoculés dans chacun des puits de la microplaque contenant 100 µL de la solution d'antifongique diluée. Des contrôles de croissance et de stérilité ont été inclus pour chacun des isolats testés. La souche de *Fusarium solani* ATCC MYA3636 a été testée en tant que contrôle interne tous les jours de réalisation de ce test. La plaque de microdilution a été incubée à 35°C et examinée 48 heures plus tard pour la détermination de la concentration minimale inhibitrice. Celle-ci a été évaluée visuellement par lecture optique en déterminant le puits présentant une inhibition complète de croissance. Tous les isolats ont été testés en duplicats pour cette méthode.

METHODE E-TEST

La méthode E-test a été réalisée en suivant les instructions des fournisseurs. Chaque gélose de milieu RPMI (épaisseur 4 mm ; AES, Bruz, France) a été inoculée en plongeant un écouvillon stérile dans la suspension de conidies non diluée et en réalisant des stries dans trois directions sur la surface entière de la gélose. Après 15 minutes de séchage, la bandelette E-test a été déposée sur la surface de la gélose ensemencée. Suite à une incubation de 48 heures à 35°C, la CMI a été déterminée par la lecture de la valeur de concentration correspondant à l'intersection inférieure entre l'ellipse d'inhibition de croissance fongique et la bandelette de molécule antifongique. La souche de *Fusarium solani* ATCC MYA3636 a servi de contrôle tous les jours de réalisation de ce test.

ANALYSE DES DONNEES

Pour chaque molécule antifongique, les concentrations minimales inhibitrices déterminées pour chaque isolat, l'intervalle de distribution des CMI, la CMI₉₀ (c'est-à-dire la valeur de CMI correspondant à 90 % des isolats testés) et la moyenne des CMI ont été déterminés pour chacune des méthodes utilisées : CLSI M38-A2 et E-test. Le pourcentage de concordance entre les deux méthodes a également été calculé dans le but de comparer ces dernières, selon la publication de Espinel-Ingroff [Espinel-Ingroff *et al.*, 2001](206). Le rendu de la valeur de CMI n'est pas directement comparable entre les deux techniques : la technique E-test repose sur un gradient continu de concentration alors que la technique CLSI est basée sur des dilutions de 2 en 2. Pour rendre ces valeurs comparables, la CMI déterminée par la technique E-test a été élevée à la valeur de dilution supérieure la plus proche correspondant à la technique CLSI M38-A2 [Espinel-Ingroff *et al.*, 2001](206). Dans le calcul du pourcentage de concordance, seuls les isolats présentant plus de 3 dilutions de divergence entre des valeurs de CMI obtenues par chacune des deux techniques ont été considérés.

Résistance par efflux

ISOLATS

Une résistance au voriconazole par mécanisme d'efflux a été explorée sur un échantillon de 5 isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani*, présentant les CMI les plus élevées globalement au regard de la population étudiée : CBS 124890, CBS 124892, CBS 124900, CBS 224.34 et MYA3636.

AGENTS BLOQUEURS D'EFFLUX

La méthodologie choisie fait intervenir des agents bloqueurs de canaux responsables de l'efflux et compare les CMI au voriconazole en l'absence ou présence de ces molécules à différentes concentrations.

Les molécules utilisées comme agents bloqueurs ont été précédemment décrites dans la littérature :

- vérapamil (Sigma) [Pina-Vaz *et al.*, 2005](207) [Pinto *et al.*, 2009](208),
- ibuprofène (Sigma) [Pina-Vaz *et al.*, 2005](207) [Pinto *et al.*, 2009](208),
- carbonyl cyanide 3-chloro-phenylhydrazone CCCP (Sigma) [Guinea *et al.*, 2006](209) [Pinto *et al.*, 2009](208).

Trois concentrations différentes de ces modulateurs ont été testées en duplicat pour chaque souche. Pour une molécule donnée, la concentration de référence a été celle proposée par

l'équipe de Pinto [Pinto *et al.*, 2009](208) et une concentration 10 fois inférieure et 10 fois supérieure à celle-ci a également été évaluée.

DETERMINATION DES CMI

La détermination des CMI au voriconazole a été réalisée par la méthode de microdilution CLSI M38-A2 décrite précédemment. L'agent bloqueur d'efflux a été ajouté à la concentration désirée dans l'inoculum de conidies dilué au 1/50^{ème} dans une solution de NaCl.

Chaque microplaque correspond à un couple isolat / agent bloqueur et présente deux lignes témoins sans addition de molécule bloquante, utilisées pour déterminer la CMI de référence. Cette dernière a été comparée à celles obtenues en présence des inhibiteurs à différentes concentrations.

Résistance par mutation de la cible CYP51

SOUCHES ETUDIÉES

Dans cette partie, tous les isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani* inclus dans l'étude de sensibilité aux antifongiques ont été analysés. Pour cela l'ADN de chacun d'eux a été extrait manuellement avec le kit High Pure PCR Template Preparation comme décrit précédemment.

GENES CIBLES

L'enzyme cible des antifongiques azolés est la 14 alpha stérol déméthylase fongique dépendante du cytochrome P450, qui est codée chez les champignons filamenteux par le gène *CYP51* et représentée par trois paralogues CYP51A, CYP51B et CYP51C chez le genre *Fusarium*. Dans le cas du complexe d'espèces *Fusarium solani*, les séquences de référence de ces protéines sont EEU 39491.1 pour CYP51A, EEU 48523.1 pour CYP51B et EEU 45708.1 pour CYP51C [Becher *et al.*, 2011](201).

En utilisant la base de données sur laquelle le génome du complexe d'espèces *Fusarium solani* est hébergé (<http://genome.jgi-psf.org/pages/search-for-genes.jsf?organism=Necha2>), les séquences nucléotidiques de chacun des loci *CYP51A* (chromosome 6), *B* (chromosome 1) et *C* (chromosome 5) ont été obtenues et utilisées pour le dessin d'amorces.

SEQUENÇAGE DE CYP51

La réaction de PCR a été réalisée suivant les protocoles et programmes mis au point dans la partie « typage », en utilisant les amorces suivantes (tableau 13). A noter que l'amplification et le séquençage de CYP51B a nécessité deux couples d'amorces se chevauchant, en raison de sa taille importante.

Tableau 13 : Amorces utilisées et taille des amplicons

Locus	Amorces (sens : F et anti-sens : R)	Taille (paires de bases)
CYP51A	F, 5'-CGCTCCCATCGGATATAGGC-3' R, 5'-GGTGAGAGTGTTGGAGGATG-3'	1731
CYP51B1	F, 5'-GTAGTCGTCATTGATGGAGG-3' R, 5'-TTTATGCTTCACTGGGCTCC-3'	1300
CYP51B2	F, 5'-GAGGAGGGCAATCATCATGT-3' R, 5'-CGTCAGGGTCTGGCGCAATT-3'	1255
CYP51C	F, 5'-CTTGTCCCAACGATGCGGAT-3' R, 5'-CCTCAATGGCAAGCATGCAG-3'	1000

A la fin de la réaction, 5µL de chaque produit d'amplification a été migré en électrophorèse sur gel d'agarose à 2 % en présence d'un agent intercalant (GelRed, Interchim) et visualisée sous UV. Les amplicons présentant un signal suffisamment important ont été transmis à la société GenoScreen pour être séquencés.

ANALYSE DES POLYMORPHISMES EN ACIDES
AMINES

Les chromatogrammes des séquences d'ADN sens et anti-sens ont été analysés en utilisant le logiciel BioEdit [Tippmann 2004](194). Pour tous les isolats étudiés, les sites de polymorphismes nucléotidiques ont ensuite été identifiés par alignement multiple sur BioEdit [Tippmann 2004](194) et vérifiés à nouveau sur les chromatogrammes.

La traduction protéique a également été obtenue sur BioEdit et un alignement entre toutes les séquences et la séquence de référence a été utilisé pour mettre en évidence des mutations en acides aminés. Toutes les modifications observées par rapport à la protéine de référence ont été consignées dans un tableau en fonction des isolats et de la position de l'acide aminé pour chaque isoforme.

RESULTATS

Détermination des CMI du complexe d'espèces *Fusarium solani* au voriconazole et à l'amphotéricine B

Pour chacun des 48 isolats d'origine clinique ou environnementale, la CMI a été déterminée par la méthode de référence CLSI M38-A2 et la technique E-test utilisée en routine. Ces deux techniques ont ensuite été comparées. Enfin, une analyse des CMI a été réalisée en fonction de l'origine des souches et de leur haplotype au sein du complexe d'espèces *Fusarium solani*.

METHODE CLSI M38-A2

Dans la population des 48 isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani*, les moyennes des CMI obtenues par la méthode de microdilution CLSI M38-A2 sont pour l'amphotéricine B de 1.2 µg/mL [0.125 – 2 µg/mL] et pour le voriconazole de 4.6 µg/mL [1 – 16 µg/mL]. La répartition des souches en fonction de la CMI, présentée en figure 33, est uni-modale. Pour la souche de contrôle FSSC ATCC MYA3636, la CMI moyenne est respectivement de 1.7 µg/mL et 4.4 µg/mL pour l'amphotéricine B et le voriconazole. Entre chaque série, les différences de CMI pour cet isolat contrôle n'ont jamais dépassé une dilution.

Résistance au Voriconazole

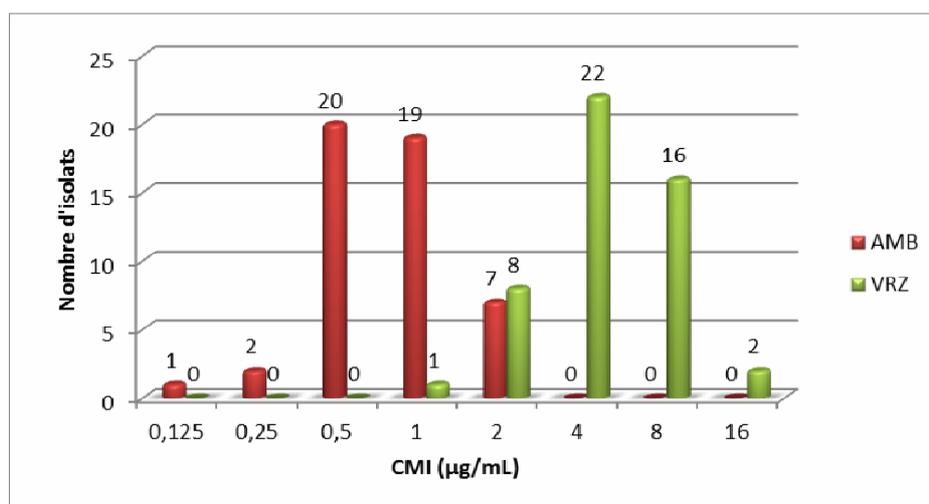


Figure 33 : Répartition des CMI de 48 isolats de FSSC déterminées par la technique CLSI pour l'amphotéricine B et le voriconazole

METHODE E-TEST

Pour la même population du complexe d'espèces *Fusarium solani*, la répartition des CMI est plus large et moins uni-modale (figure 34) que celle obtenue par la méthode CLSI avec des CMI moyennes de 1,9 µg/mL [0.064 – 32 µg/mL] et 2 µg/mL [0.25 – 32 µg/mL] respectivement pour l'amphotéricine B et le voriconazole.

Résistance au Voriconazole

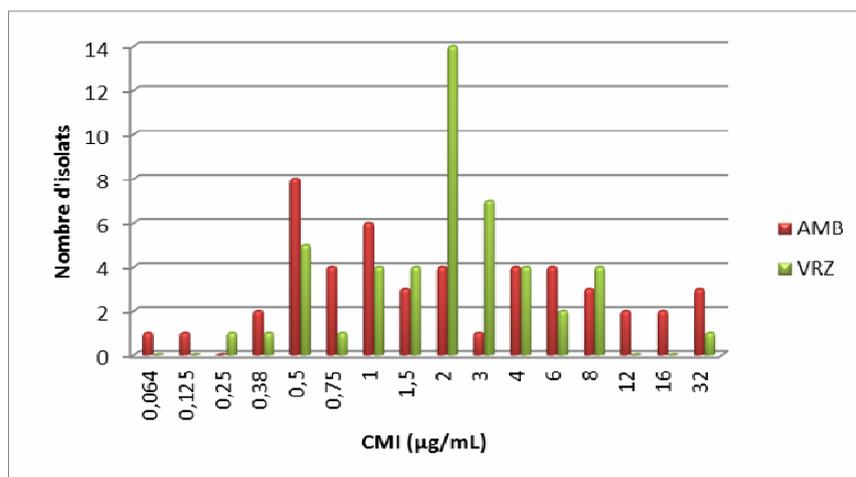


Figure 34 : Répartition des CMI de 48 isolats de FSSC déterminées par la technique E-test pour l'amphotéricine B et le voriconazole

CONCORDANCE DES DEUX METHODES

Pour les deux molécules : l'amphotéricine B et le voriconazole, testées par les deux méthodes CLSI et E-test, les CMI moyennes, les intervalles de répartition et les CMI₉₀ ont été reportées dans le tableau 14.

Tableau 14 : Caractéristiques des CMI d'une population de 48 isolats de FSSC déterminées par 2 méthodes : CLSI M38-A2 et E-test

	CMI ($\mu\text{g/mL}$)					
	Amphotéricine B			Voriconazole		
	Moyenne	Intervalle	CMI ₉₀	Moyenne	Intervalle	CMI ₉₀
CLSI M38-A2	1,2	0,125 - 2	2	4,6	1 - 16	8
E-test	1,9	0,064 - 32	16	2	0,25 - 32	8

Pour comparer les résultats obtenus par les deux techniques, le nombre de dilutions divergentes entre les valeurs de CMI des deux méthodes a été déterminé pour chaque souche et répertoriée dans le tableau 15. Le pourcentage de concordance calculé pour la population du complexe d'espèces *Fusarium solani* étudiée est de 73 % pour l'amphotéricine B alors qu'il est de 92 % pour le voriconazole.

Tableau 15 : Distribution des divergences de dilutions entre les CMI pour les deux techniques utilisées : CLSI M38-A2 et E-test

Nombre de dilution de différence	> +2	+2	+1	0	-1	-2	< -2
Amphotéricine B	13	8	13	9	4	1	0
Voriconazole	1	0	3	9	18	14	3

ANALYSE DES CMI SELON LES CARACTERISTIQUES DES ISOLATS

En premier lieu, les CMI obtenues pour une souche donnée avec les deux antifongiques apparaissent indépendantes, c'est-à-dire qu'une souche peut présenter une CMI très basse à l'amphotéricine B mais très élevée au voriconazole.

La population du complexe d'espèces *Fusarium solani* étudiée est composée de 28 isolats d'origine clinique et de 17 souches végétales. Pour trois isolats, l'origine n'est pas connue.

Pour l'amphotéricine B, la distribution des CMI obtenues par la technique CLSI M38-A2 en fonction de l'origine des isolats montre une répartition unimodale équivalente avec un décalage du mode et de la médiane d'une dilution pour les souches cliniques (figure 35).

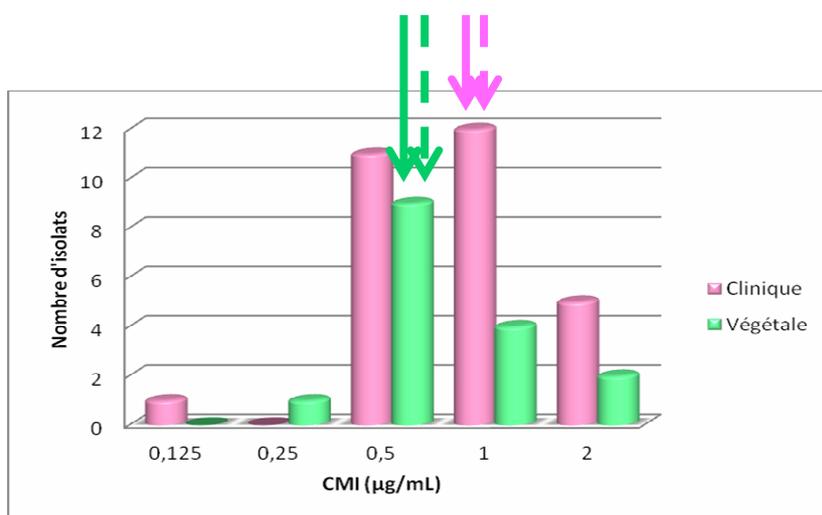


Figure 35 : Distribution des CMI en fonction de l'origine des isolats pour l'amphotéricine B (médiane en trait plein et mode en pointillé)

Ces observations sont également décrites pour le voriconazole (figure 36).

Résistance au Voriconazole

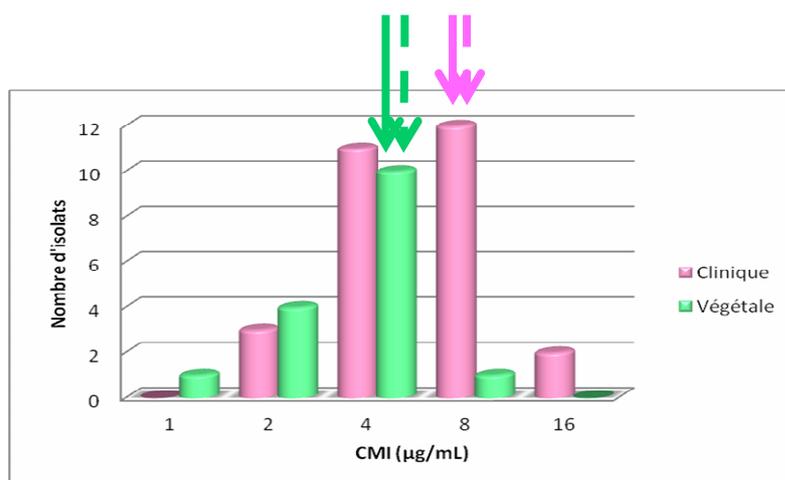


Figure 36 : Distribution des CMI en fonction de l'origine des isolats pour le voriconazole (médiane en trait plein et mode en pointillé)

Suite à l'analyse par distribution, les moyennes des CMI ont été déterminées en fonction de l'origine des isolats et synthétisées dans le tableau 16, une différence est observée en fonction de la technique de détermination des CMI.

Tableau 16 : Moyenne des CMI en fonction de l'origine des isolats et de la technique utilisée

	Moyenne CMI (µg/mL)			
	Amphotéricine B		Voriconazole	
	CLSI	E-test	CLSI	E-test
Origine clinique	1,2	4,7	5,4	2,8
Origine végétale	1,1	2,7	3,4	2,7

Aucune tendance n'a été mise en évidence en fonction des haplotypes des souches du complexe d'espèces *Fusarium solani*. Cependant, le groupe 5 de FSSC présente une majorité d'isolats avec une CMI à l'amphotéricine B de 0.5 µg/mL (6/9) et FSSC 1 à 1 µg/mL (7/8).

Pour les souches présentant un profil moléculaire équivalent, des variations de CMI d'une dilution sont observées.

Résistance par efflux

Les CMI obtenues en présence des agents bloqueurs d'efflux sont identiques à celles obtenues en leur absence, quelles que soient les souches, les molécules ou les concentrations (tableau 17).

Tableau 17 : Détermination des CMI au voriconazole en présence d'agents bloqueurs d'efflux

	Vérapamil				Ibuprofène				CCCP			
	0 μM	10 μM	100 μM	1 mM	0 mg/L	10 mg/L	100 mg/L	1 g/L	0 μg/L	50 μg/L	500 μg/L	5 mg/L
CBS 124890	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
CBS 124892	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
CBS 124900	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
CBS 224.34	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16
MYA3636	4	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8

Résistance par mutation de la cible CYP51

Le complexe d'espèces *Fusarium solani* présentant trois isoformes de l'enzyme 14 alpha stérol déméthylase, l'analyse des mutations en acides aminés sur chaque protéine a été réalisée de manière indépendante.

CYP51 A

En considérant comme référence CYP51A EEU 39491.1, la zone d'analyse de la protéine se situe entre les acides aminés 66 et 480 et 44 isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani* ont été analysés avec succès.

Le tableau 18 présente les polymorphismes en acides aminés observés. Sur un total de 414 résidus, 51 mutations ponctuelles ont été décrites.

Dans la majorité des cas, les modifications interviennent entre deux acides aminés présentant des caractéristiques physico-chimiques proches. Par exemple, en position 339, la Leucine est modifiée en Isoleucine, deux acides aminés apolaires avec une chaîne aliphatique ou en 403 où deux acides aminés basiques, l'Histidine et l'Arginine, se partagent cette position dans la population étudiée.

Aucun de ces polymorphismes n'est corrélé aux CMI des isolats vis-à-vis du voriconazole quelle que soit la technique considérée CLSI M38-A2 ou E-test.

Les polymorphismes sont par contre majoritairement dépendants de l'espèce étudiée, par exemple, tous les isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani* 21 présentent les mutations A372P et N401D, absentes chez les autres espèces. Ainsi les mutations dépendantes de l'isolat sont V69F, N100S, K131R, A232T/V, D340G et T465I.

PARTIE III

Résistance au Voriconazole

166,87	F			H			S					V			E	C	S				S					P				V				I		
109028							R	S							E			I		H			S				P				D	V				M
108942			R				S								E	C						S				P				V						
490,63				H			S								E				I		I	S				P				A	A					
224,34							S								E					H		G	S		H		P		K		V					
112100				H			S								E	C	S					S				P				V						
117608						A	S								E							S				D	P		A		V				K	
116746						A	S								E							S				D	P		A		V				K	
MYA3636				H			S								M	E						S		E		P				V						

CYP51 B

Lors de l'analyse des séquences nucléotidiques de *CYP51B* issues des différents isolats et en comparaison de la séquence de référence, différentes zones de délétion ont été observées.

Ainsi en se référant à la séquence de référence EEU 48523.1 seulement deux courts fragments situés entre les acides aminés 84 et 149 d'une part et 323 et 527 (fin) d'autre part ont été obtenus.

Le premier fragment est totalement conservé pour les 40 isolats étudiés et le second présente 10 zones de polymorphismes en acides aminés pour 204 résidus (tableau 19).

Une seule mutation indépendante des haplotypes a été identifiée : C118S.

Aucune liaison n'a été mise en évidence entre les mutations et les valeurs de CMI.

Tableau 19 : Polymorphismes en acides aminés de la protéine CYP51B

N° CBS	Polymorphismes acides aminés CYP51 B									
	328	330	352	437	439	441	442	480	495	527
124633		H						A		H
124894		H						A		H
124901		H						A		H
124630		H		V			D	A		
124629		H		V			D	A		
124895		H		V			D	A		
124896										
124889		H						A		H

PARTIE III

Résistance au Voriconazole

124627		H		V		S	D	A		
124890		H		V			D	A		
124897		H						A		H
124891		H						A		H
124898		H						A		H
124892		H		V			D	A		
124899		H						A		H
124893		H		V			D	A		
124900		H		V			D	A		
124626		H		V			D	A		
124624		H		V			D	A		
102824	F			S	S					
208,29	F			S	S					
181,29										
119996		H		V			D	A		
119223		H	Y	V				A		H
118931		H		V				A		H
115659		H	Y	V				A		H
165,87		H		V			D	A		
231,31										
121450		H		V			D	A		
115660		H	Y	V				A		H
115658		H	Y	V				A		H
115045				S	S				L	
166,87		H		V			D	A		
109028				S	S					
108942		H		V			D	A		
490,63		H						A		H
112100		H		V			D	A		
117608		E		S	S					
116746		E		S	S					
MYA3636		H		V			D	A		

CYP51 C

L'analyse de la protéine CYP51C a été réalisée en se référant à la région comprise entre les acides aminés 142 et 400 de la séquence EEU 45708.1 pour 44 isolats du complexe d'espèces *Fusarium solani*.

Quinze zones de polymorphismes ont été identifiées pour 258 acides aminés et sont décrites dans le tableau 20.

Comme pour les autres isoformes de CYP51, aucun lien n'a été mis en évidence entre les mutations et les valeurs de CMI (quelle que soit la technique d'évaluation des CMI utilisée).

Tableau 20 : Polymorphismes en acides aminés de la protéine CYP51C

N° CBS	Polymorphismes acides aminés CYP51 C														
	17 3	25 3	30 0	32 8	33 2	37 2	37 6	38 0	38 3	38 5	39 1	40 0	40 1	40 2	40 3
124633															
124894															
124901									G						
124631												H	D	P	Q
124630		K													
124629															
124896															
124628															
124623															
124889															
124627															
124890															

PARTIE III

Résistance au Voriconazole

124897														
124891										N				
124898														
124892														
124899														
124893														
124900														
124626				H										
124625														
124624														
102824														
115695					Q									
208,29														
181,29														
119996							A							
119223						Q								
118931	L					Q								
117481														
115659														
165,87														
231,31			V											
121450														
115660														
115658														
166,87							L							
109028									I					
108942							L							
490,63														
224,34														
117608														
116746														
MYA3636		K												

DISCUSSION

Au sein du complexe d'espèces *Fusarium solani*, l'interprétation de la sensibilité ou de la résistance à l'amphotéricine B et au voriconazole est rendue difficile par l'absence de seuils reconnus dans la littérature. Dans notre étude, les données obtenues ont donc été comparées à celles des études de sensibilité utilisant également la méthode CLSI. Pour le voriconazole, la moyenne et l'intervalle de distribution des CMI (1 – 16 µg/mL) sont similaires à ceux des autres études [Arikan *et al.*, 1999](210) [Paphitou *et al.*, 2002](157) [Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2008](141) [Espinel-Ingroff *et al.*, 2008](155). Ces valeurs, supérieures ou égales à 1 µg/mL, sont élevées en comparaison des seuils définis pour *Aspergillus fumigatus*. Dans le cas de l'amphotéricine B, la gamme des valeurs de CMI (0.125 – 2 µg/mL) est plus basse que dans les autres études, où la CMI maximale peut atteindre 16 µg/mL [Paphitou *et al.*, 2002](157) [Cordoba *et al.*, 2008](152). Cependant, l'équipe de Tortorano [Tortorano *et al.*, 2008](211) ainsi que d'autres auteurs [Iqbal *et al.*, 2008](156) [Xie *et al.*, 2008](40) ont rapportés des données similaires aux nôtres.

Pour l'étude de sensibilité à l'amphotéricine B, le milieu RPMI a été utilisé conformément aux recommandations de la méthode CLSI. Bien que selon certains auteurs, l'utilisation de ce milieu ne permette pas de détecter les souches résistantes de façon optimale, et notamment pour *Aspergillus fumigatus*, les différences de CMI obtenues dans la littérature pour le complexe d'espèces *Fusarium solani* avec les milieux RPMI et AM3 sont minimales [Arikan *et al.*, 1999](210).

Dans cette étude d'évaluation de la sensibilité aux antifongiques, la méthode en microdilution CLSI M38-A2 qui est la technique de référence a été comparée à la technique E-test, utilisée en pratique clinique quotidienne. Cette dernière sur-estime les CMI de l'amphotéricine B mais sous-estime celles du voriconazole, par rapport à la méthode CLSI. A notre connaissance, il s'agit des premières données de CMI déterminées par les bandelettes E-test pour le voriconazole pour une population du complexe d'espèces *Fusarium solani*. Pour

l'amphotéricine B, le pourcentage de concordance entre les deux techniques a déjà été calculé dans d'autres études et était de 40 % [Espinel-Ingroff *et al.*, 2001](206) et de 80 % [Szekely *et al.*, 1999](212) ; cependant les discordances entre les valeurs de CMI ont été évaluées à partir d'une divergence de deux dilutions au lieu de trois pour la seconde étude [Szekely *et al.*, 1999](212). La concordance entre ces deux méthodes a été décrite pour d'autres moisissures et elle est plus faible pour le complexe d'espèces *Fusarium solani* que pour les espèces du genre *Aspergillus* [Espinel-Ingroff *et al.*, 2001](206) [Szekely *et al.*, 1999](212).

D'après les données produites dans notre étude, une interrogation se pose sur la valeur à accorder aux résultats de la technique E-test dans la pratique quotidienne des laboratoires d'analyses médicales. Par exemple, un isolat clinique issu de notre population testée présente pour l'amphotéricine B une CMI à 0,5 µg/mL par la méthode CLSI M38-A2 et à 12 µg/mL en utilisant les bandelettes E-test. En utilisant la méthode de référence, le mycologue considérerait que l'antifongique pourrait être actif, alors qu'une interprétation contraire aurait été réalisée avec la technique E-test. En complément des caractéristiques pharmacocinétiques de la molécule antifongique chez l'Homme, quelle valeur est la plus prédictive de l'activité de l'amphotéricine *in vivo* et de l'évolution clinique de la mycose ?

L'amphotéricine B est la molécule la plus active contre le complexe d'espèces *Fusarium solani*. Cette observation est cohérente avec les évolutions cliniques favorables décrites chez les patients traités avec les formulations lipidiques d'amphotéricine B [Campo *et al.*, 2010](121). Le voriconazole semble moins actif *in vitro*, cependant une étude récente montre l'efficacité de cette molécule dans le traitement de la fusariose [Lortholary *et al.*, 2010](43). Ces éléments montrent donc les difficultés de la corrélation *in vitro* entre les méthodes de détection de la sensibilité aux antifongiques, particulièrement pour le complexe d'espèces *Fusarium solani* comparé aux autres champignons filamenteux, tels que le genre *Aspergillus*. Les corrélations entre les données de sensibilité *in vitro* et les résultats d'essais cliniques ou l'évolution de cas cliniques est encore plus difficile à établir. En effet, plusieurs facteurs sont impliqués, tels que le nombre de patients inclus dans les études cliniques, le rôle de la reconstitution immunitaire, le délai d'initiation d'un traitement antifongique.

La multirésistance du complexe d'espèces a été montrée [Cuenca-Estrella *et al.*, 2006](153). Cependant, en raison de la diversité d'espèces et de biotopes de ce complexe, les données de sensibilité ont été analysées dans notre étude en fonction de la nomenclature et de l'origine des souches. L'équipe de O'Donnell avait initié cette démarche en testant la sensibilité à différents antifongiques sur 18 espèces différentes du complexe d'espèces *Fusarium solani* mais la distribution des CMI s'est révélée aléatoire au sein du clade 3 [O'Donnell *et al.*, 2008](6). Dans la présente étude, cette observation a été confirmée et, pour la première fois, l'origine des isolats a été considérée comme facteur de variation. Néanmoins, la formulation d'hypothèses conséquentes à cette analyse nécessite un échantillonnage plus important.

Devant cette sensibilité diminuée au voriconazole, différents mécanismes de résistance ont été explorés tels que la présence d'un phénomène d'efflux. Malgré l'utilisation de trois agents bloqueurs (vérapamil, ibuprofène, CCCP) à trois concentrations différentes, aucune variation des CMI n'a été observée en présence de ces molécules. Ainsi, le rôle des pompes à efflux n'est pas démontré dans la résistance au voriconazole des souches du complexe d'espèces *Fusarium solani* sélectionnées. Cependant, les molécules utilisées pour bloquer les pompes à efflux ont précédemment été utilisées pour le genre *Candida* [Pinto *et al.*, 2009](208), mais jamais pour le genre *Fusarium*.

De ce fait, les résultats de cette première approche sur les pompes à efflux pourront être ultérieurement complétés et vérifiés par l'exploration de ce phénomène par des techniques plus complexes, telles que la recherche de gènes codant pour des protéines de la famille de transporteurs ABC [Nascimento *et al.*, 2003](213), ou des analyses par cytométrie en flux avec FUN-1 [Pina-Vaz *et al.*, 2005](207) ou la rhodamine [Pinto *et al.*, 2009](208).

Un autre mécanisme de résistance fréquemment rencontré chez les champignons est la mutation de la cible des azolés, la 14 alpha stérol déméthylase. De manière originale, le genre *Fusarium* présente trois isoformes de cette enzyme [Becher *et al.*, 2011](201).

La protéine CYP51C, additionnelle par rapport aux autres champignons, est relativement conservée dans la zone que nous avons étudiée avec 15 mutations pour 258 acides aminés, réparties sur un ou deux isolats.

L'analyse de CYP51B a posé des difficultés lors de la phase de traduction puisque de nombreux isolats présentaient des zones d'insertion dans le gène par rapport à la séquence de référence. Ces insertions sont composées de zones répétées avec un même motif de deux ou trois nucléotides répétés un nombre de fois différents entre les souches. De ce fait, l'analyse protéique n'a pu être réalisée que sur deux fragments, peu polymorphes (10 mutations pour 269 résidus). La protéine n'a été retrouvée dans sa totalité que chez trois isolats de la même espèce FSSC 11, il est donc légitime de s'interroger sur la fonction de cette protéine dans la cellule et son rôle. La présence inconstante de CYP51B pourrait être en lien avec la présence de CYP51C. Une hypothèse à considérer serait qu'au cours de l'évolution, CYP51C se substitue progressivement à CYP51B. Chez *Aspergillus fumigatus*, de rares mutations ont été mises en évidence sur CYP51B, cependant aucune n'a jamais été liée à une résistance aux azolés [Camps *et al.*, 2012](204) mais un phénomène de sur-expression a été décrit [Buied *et al.*, 2012](214).

CYP51A est la protéine la plus touchée par les mutations non silencieuses (51 pour 414 acides aminés observés). Cependant, les polymorphismes sont pour la plupart liés à l'espèce de *Fusarium solani* considérée, mais six mutations semblent isolats dépendantes. Les acides aminés interchangeés sont majoritairement de même nature physico-chimique sauf en position 340 où la glycine remplace l'acide aspartique. En effet, ces caractéristiques sont très importantes puisqu'elles ont une répercussion directe sur la conformation de la protéine et donc dans l'interaction entre l'antifongique et l'enzyme si la mutation a lieu au niveau du site actif par exemple [Alcazar-Fuoli *et al.*, 2011](215). Une des souches étudiées présente trois des six mutations observées, mais les CMI au voriconazole déterminées par les techniques CLSI M38-A2 et E-test sont respectivement de 4 et 1.5 µg/mL. Donc le lien entre ces mutations et une résistance au voriconazole ne peut être établi.

Chez *Aspergillus fumigatus*, les mutations associées à une résistance aux azolés sont présentes sur CYP51A, la pression de sélection est elle donc plus forte sur le gène correspondant ? Bien que la séquence protéique soit peu conservée entre les genres

Aspergillus et *Fusarium*, les points de mutations L98H et M220T n'ont pas été mis en évidence pour les souches du complexe d'espèces *Fusarium solani* étudiées.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Le complexe d'espèces *Fusarium solani* regroupe des champignons phytopathogènes dont les implications sont majeures en agriculture. De plus, il est également représenté en pathologie humaine dans des infections parfois profondes et souvent de mauvais pronostic. De ce fait, une meilleure connaissance de ces pathogènes est indispensable.

Dans un premier temps, un schéma de MLST a été développé et validé pour le complexe d'espèces *Fusarium solani* en sélectionnant des gènes de ménage habituellement utilisés dans cette technique de typage moléculaire développée pour d'autres champignons. Après comparaison à la technique de référence utilisée en phylogénie et pour clarifier la nomenclature, un schéma consensus a été proposé combinant les complémentarités de chacune des techniques.

Dans un second temps, une étude de la sensibilité de ce pathogène aux molécules antifongiques utilisées en clinique : amphotéricine B et voriconazole a été menée. Deux techniques de détermination des CMI, par microdilution CLSI M38-A2 et par bandelettes E-test, ont été mises en œuvre et la concordance de celles-ci a été évaluée.

Devant le paradoxe entre une sensibilité diminuée *in vitro* de ce pathogène au voriconazole et la recommandation de cette molécule pour le traitement curatif de la fusariose humaine, une exploration des mécanismes de résistance a été conduite. L'hypothèse d'un phénomène d'efflux n'a pas été retenue alors que celle d'une modification de la cible, la 14 alpha stérol déméthylase, sera approfondie lors de de travaux complémentaires.

Le mécanisme de résistance aux azolés est connu pour le genre *Candida* et est en cours d'investigation depuis ces dernières années pour *Aspergillus fumigatus*. En revanche, aucune donnée n'est disponible pour le complexe d'espèces *Fusarium solani*. De par cette dualité entre l'impact du genre *Fusarium* en agriculture et sa présence en clinique humaine, quelques données émergent sur le mécanisme de résistance de *Fusarium graminearum* au tebuconazole, un fongicide utilisé en agriculture [Liu *et al.*, 2011](203).

Les perspectives de ce travail seront donc de déterminer le rôle respectif de chacune des protéines CYP51 sur la cellule fongique, sa survie, sa croissance mais aussi sur la résistance du champignon aux azolés et de comprendre comment ces protéines interagissent entre elles. Une délétion indépendante de chacun des gènes *CYP51* permettrait de répondre à ces questions.

La technique de mutagénèse choisie est l'ATMT : *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Cette technique exploite la capacité naturelle de cette bactérie phytopathogène à transférer une partie de son ADN à d'autres cellules, initialement de plantes. L'ADN transféré se situe sur un long plasmide et est encadré par deux séquences répétées à droite et à gauche. Ces dernières constituent des sites de reconnaissance d'une endonucléase, qui associée à une hélicase, permet le transfert de l'ADN cible dans la cellule hôte [Frandsen *et al.*, 2012](216).

Cette méthode présente plusieurs avantages [Frandsen *et al.*, 2012](216) [Frandsen *et al.*, 2011](217):

- elle est applicable à de nombreux champignons et notamment au genre *Fusarium* et devient par conséquent la technique de référence de transformation en mycologie ;
- le rendement de la transformation est supérieur à celui des autres techniques, par exemple de l'ordre de 100 fois par rapport à l'électroporation ;
- l'intégration de l'ADN est stable ;
- elle respecte l'intégrité de la paroi du champignon, contrairement à l'électroporation.

Les différentes étapes de cette technique ATMT sont :

- le dessin des amorces pour les zones de recombinaisons homologues situées de part et d'autre du gène d'intérêt, comprenant des extensions spécifiques du plasmide utilisé ;
- la préparation du vecteur pRF-HU2, comprenant une linéarisation avec des enzymes de restriction et une purification ;
- le clonage avec le système USER, un kit de clonage ;

- la vérification du plasmide construit ;
- la préparation des cellules d'*Agrobacterium tumefaciens* électro-compétentes ;
- l'électroporation d'*Agrobacterium tumefaciens* ;
- la préparation des spores de *Fusarium solani* ;
- la transformation ATMT ;
- le screening et la validation des transformants [Frandsen *et al.*, 2012](216).

Une fois ces cellules mutantes obtenues, différents critères tels que leur vitesse de croissance, leur structure microscopique et les concentrations minimales inhibitrices aux azolés seront déterminés par rapport au même isolat sauvage. L'effet de cette délétion sera également observé sur les autres gènes *CYP51* comme par exemple par une éventuelle compensation par surexpression.

L'ensemble des travaux menés lors de cette thèse d'Université a permis d'apporter de nouveaux outils de typage moléculaire et de nouvelles connaissances et pistes d'études quant à la résistance du complexe d'espèces *Fusarium solani* au voriconazole.

Ceci a été valorisé par trois publications présentées en intégralité en annexes.

La synthèse bibliographique fait l'objet de deux articles didactiques en cours de soumission dans l'Encyclopédie Médico Chirurgicale.

BIBLIOGRAPHIE

1. Summerbell RC, Schroers H-J. Analysis of phylogenetic relationship of *Cylindrocarpon lichenicola* and *Acremonium falciforme* to the *Fusarium solani* species complex and a review of similarities in the spectrum of opportunistic infections caused by these fungi. *J. Clin. Microbiol.* août 2002;40(8):2866-2875.
2. De Hoog S, Guarro J, Gené J, Figueras M. *Atlas of Clinical Fungi*. 2011.
3. Zhang N, O'Donnell K, Sutton DA, Nalim FA, Summerbell RC, Padhye AA, et al. Members of the *Fusarium solani* Species Complex That Cause Infections in Both Humans and Plants Are Common in the Environment. *Journal of Clinical Microbiology*. 6 juin 2006;44(6):2186-2190.
4. Leslie JF, Anderson LL, Bowden RL, Lee YW. Inter-and intra-specific genetic variation in *Fusarium*. *International journal of food microbiology*. 2007;119(1-2):25-32.
5. Chang DC. Multistate Outbreak of *Fusarium* Keratitis Associated With Use of a Contact Lens Solution. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*. 23 août 2006;296(8):953-963.
6. O'Donnell K, Sutton DA, Fothergill A, McCarthy D, Rinaldi MG, Brandt ME, et al. Molecular Phylogenetic Diversity, Multilocus Haplotype Nomenclature, and In Vitro Antifungal Resistance within the *Fusarium solani* Species Complex. *Journal of Clinical Microbiology*. 4 juin 2008;46(8):2477-2490.
7. Park B, Park J, Cheong KC, Choi J, Jung K, Kim D, et al. Cyber infrastructure for *Fusarium*: three integrated platforms supporting strain identification, phylogenetics, comparative genomics and knowledge sharing. *Nucleic Acids Research*. 2011;39(suppl 1):D640-D646.
8. Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. *Clinical Microbiology and Infection*. 2004;10:67-75.
9. Palmero D, Rodríguez JM, Cara M, Camacho F, Iglesias C, Tello JC. Fungal microbiota from rain water and pathogenicity of *Fusarium* species isolated from atmospheric dust and rainfall dust. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 5 sept 2010;38(1):13-20.
10. Coleman JJ, Rounsley SD, Rodriguez-Carres M, Kuo A, Wasmann CC, Grimwood J, et al. The Genome of *Nectria haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion. Madhani HD, éditeur. *PLoS Genetics*. 28 août 2009;5(8):e1000618.
11. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clinical Microbiology Reviews*. 12 oct 2007;20(4):695-704.

12. Jurado V, Porca E, Cuezva S, Fernandez-Cortes A, Sanchez-Moral S, Saiz-Jimenez C. Fungal outbreak in a show cave. *Science of the Total Environment*. 2010;408(17):3632-8.
13. Dupont J, Jacquet C, Denetière B, Lacoste S, Bousta F, Oriol G, et al. Invasion of the French Paleolithic painted cave of Lascaux by members of the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia*. 2007;99(4):526-33.
14. Bastian F, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave. *Journal of applied microbiology*. 2009;106(5):1456-62.
15. Bastian F, Jurado V, Nováková A, Alabouvette C, Saiz-Jimenez C. The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology*. 2010;156(3):644-52.
16. Brandi G, Sisti M, Papparini A, Gianfranceschi G, Schiavano GF, De Santi M, et al. Swimming pools and fungi: An environmental epidemiology survey in Italian indoor swimming facilities. *International Journal of Environmental Health Research*. juin 2007;17(3):197-206.
17. Buot G, Toutous-Trellu L, Hennequin C. Swimming pool deck as environmental reservoir of *Fusarium*. *Medical Mycology*. 2010;48(5):780-4.
18. Short DPG, O'Donnell K, Zhang N, Juba JH, Geiser DM. Widespread occurrence of diverse human pathogenic types of the fungus *Fusarium* detected in plumbing drains. *J. Clin. Microbiol.* déc 2011;49(12):4264-4272.
19. Anaissie EJ, Kuchar RT, Rex JH, Francesconi A, Kasai M, Müller FMC, et al. Fusariosis associated with pathogenic *Fusarium* species colonization of a hospital water system: a new paradigm for the epidemiology of opportunistic mold infections. *Clinical infectious diseases*. 2001;33(11):1871.
20. Kauffmann-Lacroix C, Bousseau A, Dalle F, Brenier-Pinchart M-P, Delhaes L, Machouart M, et al. Surveillance mycologique de l'eau pour la prévention des mycoses invasives dans les établissements de santé. *La Presse Médicale*. mai 2008;37(5):751-759.
21. Mehl HL, Epstein L. Sewage and community shower drains are environmental reservoirs of *Fusarium solani* species complex group 1, a human and plant pathogen. *Environmental microbiology*. 2008;10(1):219-27.
22. Sautour M, Edel-Hermann V, Steinberg C, Sixt N, Laurent J, Dalle F, et al. *Fusarium* species recovered from the water distribution system of a French university hospital. *International journal of hygiene and environmental health* [Internet]. 2011 [cité 28 janv 2013]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1438463911002148>

23. Pires-Gonçalves RH, Sartori FG, Montanari LB, Zaia JE, Melhem MSC, Mendes-Giannini MJS, et al. Occurrence of fungi in water used at a haemodialysis centre. *Letters in applied microbiology*. 2008;46(5):542-7.
24. Pitt JI. Toxigenic fungi: which are important? *Medical Mycology*. 2000;38(s1):17-22.
25. Naiker S, Odhav B. Mycotic keratitis: profile of *Fusarium* species and their mycotoxins. *Mycoses*. 2004;47(1-2):50-6.
26. Moretti A, Ferracane L, Somma S, Ricci V, Mulè G, Susca A, et al. Identification, mycotoxin risk and pathogenicity of *Fusarium* species associated with fig endosepsis in Apulia, Italy. *Food Additives & Contaminants: Part A*. mai 2010;27(5):718-728.
27. Richard E, Heutte N, Sage L, Pottier D, Bouchart V, Lebailly P, et al. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. *Food and Chemical Toxicology*. 2007;45(12):2420-5.
28. Shweta S, Zuehlke S, Ramesha BT, Priti V, Mohana Kumar P, Ravikanth G, et al. Endophytic fungal strains of *Fusarium solani*, from *Apodytes dimidiata* E. Mey. ex Arn (Icacinaceae) produce camptothecin, 10-hydroxycamptothecin and 9-methoxycamptothecin. *Phytochemistry*. 2010;71(1):117-22.
29. Al-Reedy RM, Malireddy R, Dillman CB, Kennell JC. Comparative analysis of *Fusarium* mitochondrial genomes reveals a highly variable region that encodes an exceptionally large open reading frame. *Fungal Genetics and Biology*. janv 2012;49(1):2-14.
30. Rep M, Kistler HC. The genomic organization of plant pathogenicity in *Fusarium* species. *Current Opinion in Plant Biology*. 1 août 2010;13(4):420-426.
31. Gupta AK, Baran R, Summerbell RC. *Fusarium* infections of the skin. *Current opinion in infectious diseases*. 2000;13(2):121.
32. Ahearn DG, Zhang S, Stulting RD, Schwam BL, Simmons RB, Ward MA, et al. *Fusarium* keratitis and contact lens wear: facts and speculations. *Med. Mycol.* août 2008;46(5):397-410.
33. Dyavaiah M, Ramani R, Chu D, Ritterband D, Shah M, Samsonoff W, et al. Molecular characterization, biofilm analysis and experimental biofouling study of *Fusarium* isolates from recent cases of fungal keratitis in New York State. *BMC ophthalmology*. 2007;7(1):1.
34. Imamura Y, Chandra J, Mukherjee PK, Lattif AA, Szczotka-Flynn LB, Pearlman E, et al. *Fusarium* and *Candida albicans* Biofilms on Soft Contact Lenses: Model Development,

Influence of Lens Type, and Susceptibility to Lens Care Solutions. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 12 nov 2007;52(1):171-182.

35. Mukherjee PK, Chandra J, Yu C, Sun Y, Pearlman E, Ghannoum MA. Characterization of *Fusarium* keratitis outbreak isolates: Contribution of biofilms to antimicrobial resistance and pathogenesis. *Investigative ophthalmology & visual science* [Internet]. 5 juin 2012 [cité 13 juin 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22669723>
36. Mayayo E, Pujol I, Guarro J. Experimental pathogenicity of four opportunist *Fusarium* species in a murine model. *Journal of medical microbiology*. 1999;48(4):363-6.
37. Zhu J-L, Gao X-R, Cui H-P, Lang L-L, Li Q, Liao X. Experimental model of *Fusarium solani* keratitis in rats. *Int J Ophthalmol*. 2011;4(4):371-376.
38. Ahearn DG, Simmons RB, Zhang S, Stulting RD, Crow SA Jr, Schwam BL, et al. Attachment to and penetration of conventional and silicone hydrogel contact lenses by *Fusarium solani* and *Ulocladium* sp. in vitro. *Cornea*. août 2007;26(7):831-839.
39. Ahearn DG, Ahear DG, Zhang S, Stulting RD, Schwam BL, Simmons RB, et al. Relative in vitro rates of attachment and penetration of hydrogel soft contact lenses by haplotypes of *Fusarium*. *Cornea*. mai 2009;28(4):447-450.
40. Xie L, Zhai H, Shi W, Zhao J, Sun S, Zang X. Hyphal growth patterns and recurrence of fungal keratitis after lamellar keratoplasty. *Ophthalmology*. juin 2008;115(6):983-987.
41. Ortoneda M, Guarro J, Madrid MP, Caracuel Z, Roncero MIG, Mayayo E, et al. *Fusarium oxysporum* as a multihost model for the genetic dissection of fungal virulence in plants and mammals. *Infection and immunity*. 2004;72(3):1760-6.
42. Prados-Rosales RC, Serena C, Delgado-Jarana J, Guarro J, Di Pietro A. Distinct signalling pathways coordinately contribute to virulence of *Fusarium oxysporum* on mammalian hosts. *Microbes and infection*. 2006;8(14):2825-31.
43. Lortholary O, Obenga G, Biswas P, Caillot D, Chachaty E, Bienvenu A-L, et al. International Retrospective Analysis of 73 Cases of Invasive Fusariosis Treated with Voriconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 12 juill 2010;54(10):4446-4450.
44. Nucci M, Anaissie EJ, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Solza C, et al. Outcome predictors of 84 patients with hematologic malignancies and *Fusarium* infection. *Cancer*. 15 juill 2003;98(2):315-319.

45. Legrand C, Anaissie E, Hashem R, Nelson P, Bodey GP, Ro J. Experimental fusarial hyalohyphomycosis in a murine model. *J. Infect. Dis.* nov 1991;164(5):944-948.
46. Shoham S, Levitz SM. The immune response to fungal infections. *British journal of haematology.* 2005;129(5):569-82.
47. Gaviria JM, Van Burik JAH, Dale DC, Root RK, Liles WC. Comparison of interferon- γ , granulocyte colony-stimulating factor, and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor for priming leukocyte-mediated hyphal damage of opportunistic fungal pathogens. *Journal of Infectious Diseases.* 1999;179(4):1038-41.
48. Winn RM, Gil-Lamagnere C, Roilides E, Simitsopoulou M, Lyman CA, Maloukou A, et al. Effects of interleukin-15 on antifungal responses of human polymorphonuclear leukocytes against *Fusarium* spp. and *Scedosporium* spp. *Cytokine.* 2005;31(1):1-8.
49. Romani L. Immunity to fungal infections. *Nat. Rev. Immunol.* janv 2004;4(1):1-23.
50. Wu TG, Keasler VV, Mitchell BM, Wilhelmus KR. Immunosuppression affects the severity of experimental *Fusarium solani* keratitis. *Journal of Infectious Diseases.* 2004;190(1):192-8.
51. Hu J, Wang Y, Xie L. Potential role of macrophages in experimental keratomycosis. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* mai 2009;50(5):2087-2094.
52. Tarabishy AB, Aldabagh B, Sun Y, Imamura Y, Mukherjee PK, Lass JH, et al. MyD88 regulation of *Fusarium* keratitis is dependent on TLR4 and IL-1R1 but not TLR2. *The Journal of Immunology.* 2008;181(1):593-600.
53. Sun Y, Chandra J, Mukherjee P, Szczotka-Flynn L, Ghannoum MA, Pearlman E. A murine model of contact lens-associated *Fusarium* keratitis. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2010;51(3):1511-6.
54. Jin X, Qin Q, Tu L, Zhou X, Lin Y, Qu J. Toll-like receptors (TLRs) expression and function in response to inactivate hyphae of *Fusarium solani* in immortalized human corneal epithelial cells. *Molecular vision.* 2007;13:1953.
55. Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, et al. Characterization of the Oral Fungal Microbiome (Mycobiome) in Healthy Individuals. *May RC, éditeur. PLoS Pathogens.* 8 janv 2010;6(1):e1000713.
56. Scupham AJ, Presley LL, Wei B, Bent E, Griffith N, McPherson M, et al. Abundant and diverse fungal microbiota in the murine intestine. *Applied and environmental microbiology.* 2006;72(1):793-801.

57. Moreno G, Arenas R. Other fungi causing onychomycosis. *Clinics in dermatology*. 2010;28(2):160-3.
58. Godoy P, Nunes F, Silva V, Tomimori-Yamashita J, Zaror L, Fischman O. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* and *Fusarium oxysporum* in São Paulo, Brazil. *Mycopathologia*. 2004;157(3):287-90.
59. Ninet B, Jan I, Bontems O, L'écuyer B, Jousson O, Lew D, et al. Molecular Identification of *Fusarium* Species in Onychomycoses. *Dermatology*. 2005;210(1):21-25.
60. Castro López N, Casas C, Sopo L, Rojas A, Del Portillo P, Cepero de García MC, et al. *Fusarium* species detected in onychomycosis in Colombia. *Mycoses* [Internet]. 12 sept 2008 [cité 24 juin 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18793261>
61. Tosti A, Piraccini BM, Lorenzi S. Onychomycosis caused by nondermatophytic molds: clinical features and response to treatment of 59 cases. *J. Am. Acad. Dermatol.* févr 2000;42(2 Pt 1):217-224.
62. Ebihara M, Makimura K, Sato K, Abe S, Tsuboi R. Molecular detection of dermatophytes and nondermatophytes in onychomycosis by nested polymerase chain reaction based on 28S ribosomal RNA gene sequences. *British Journal of Dermatology*. nov 2009;161(5):1038-1044.
63. Hwang SM, Suh MK, Ha GY. Onychomycosis due to nondermatophytic molds. *Ann Dermatol.* mai 2012;24(2):175-180.
64. Baran R, Faergemann J, Hay RJ. Superficial white onychomycosis—a syndrome with different fungal causes and paths of infection. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 2007;57(5):879-82.
65. Lee HJ, Koh BK, Moon JS, Kim SO, Kim SJ, Ha SJ, et al. A case of melanonychia caused by *Fusarium solani*. *Br. J. Dermatol.* sept 2002;147(3):607-608.
66. Yang Y-S, Ahn J-J, Shin M-K, Lee M-H. *Fusarium solani* onychomycosis of the thumbnail coinfecting with *Pseudomonas aeruginosa*: report of two cases. *Mycoses*. mars 2011;54(2):168-171.
67. Summerbell RC. Epidemiology and ecology of onychomycosis. *Dermatology (Basel)*. 1997;194 Suppl 1:32-36.
68. Wu CY, Chen GS, Lan CCE. Onychomycosis caused by *Fusarium solani* in a woman with diabetes. *Clinical and Experimental Dermatology*. 2009;34(8):e772-e774.

69. Tomimori-Yamashita J, Ogawa MM, Hirata SH, Fischman O, Michalany NS, Yamashita HK, et al. Mycetoma caused by *Fusarium solani* with osteolytic lesions on the hand: case report. *Mycopathologia*. 2002;153(1):11-4.
70. Katkar VJ, Tankhiwale SS, Kurhade A. *Fusarium solani* mycetoma. *Indian J Dermatol*. mai 2011;56(3):315-317.
71. Negroni R, López Daneri G, Arechavala A, Bianchi MH, Robles AM. [Clinical and microbiological study of mycetomas at the Muñiz hospital of Buenos Aires between 1989 and 2004]. *Rev. Argent. Microbiol*. mars 2006;38(1):13-18.
72. Yera H, Bournoux ME, Jeanrot C, Baixench MT, De Pinieux G, Dupouy-Camet J. Mycetoma of the foot caused by *Fusarium solani*: identification of the etiologic agent by DNA sequencing. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(4):1805-8.
73. He D, Hao J, Zhang B, Yang Y, Song W, Zhang Y, et al. Pathogenic Spectrum of Fungal Keratitis and Specific Identification of *Fusarium solani*. *Investigative Ophthalmology & Visual Science*. 27 janv 2011;52(5):2804-2808.
74. Alfonso EC. Genotypic identification of *Fusarium* species from ocular sources: comparison to morphologic classification and antifungal sensitivity testing (an AOS thesis). *Transactions of the American Ophthalmological Society*. 2008;106:227.
75. Wykoff CC, Flynn HW, Miller D, Scott IU, Alfonso EC. Exogenous fungal endophthalmitis: microbiology and clinical outcomes. *Ophthalmology*. 2008;115(9):1501-7.
76. Dursun D, Fernandez V, Miller D, Alfonso EC. Advanced fusarium keratitis progressing to endophthalmitis. *Cornea*. mai 2003;22(4):300-303.
77. Edelstein SL, Akduman L, Durham BH, Fothergill AW, Hsu HY. Resistant *Fusarium* Keratitis Progressing to Endophthalmitis. *Eye Contact Lens* [Internet]. 8 oct 2011 [cité 7 juin 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993589>
78. Nath R, Baruah S, Saikia L, Devi B, Borthakur AK, Mahanta J. Mycotic corneal ulcers in upper Assam. *Indian J Ophthalmol*. oct 2011;59(5):367-371.
79. Brasnu E, Bourcier T, Dupas B, Degorge S, Rodallec T, Laroche L, et al. In vivo confocal microscopy in fungal keratitis. *British Journal of Ophthalmology*. 6 déc 2006;91(5):588-591.
80. Güngel H, Eren MH, Pınarcı EY, Altan Ç, Baylanççek DO, Kara N, et al. An outbreak of *Fusarium solani* endophthalmitis after cataract surgery in an eye training and research hospital in Istanbul. *Mycoses*. 2011;

81. Epstein AB. In the aftermath of the Fusarium keratitis outbreak: What have we learned? *Clin Ophthalmol.* déc 2007;1(4):355-366.
82. Ma SE, So K, Chung P, Tsang HT, Chuang S. A multi-country outbreak of fungal keratitis associated with a brand of contact lens solution: the Hong Kong experience. *International Journal of Infectious Diseases.* juill 2009;13(4):443-448.
83. Khor W-B. An Outbreak of Fusarium Keratitis Associated With Contact Lens Wear in Singapore. *JAMA: The Journal of the American Medical Association.* 28 juin 2006;295(24):2867-2873.
84. Saw S-M, Ooi P-L, Tan DTH, Khor W-B, Fong C-W, Lim J, et al. Risk factors for contact lens-related fusarium keratitis: a case-control study in Singapore. *Arch. Ophthalmol.* mai 2007;125(5):611-617.
85. Bernal MD, Acharya NR, Lietman TM, Strauss EC, McLeod SD, Hwang DG. Outbreak of Fusarium keratitis in soft contact lens wearers in San Francisco. *Arch. Ophthalmol.* juill 2006;124(7):1051-1053.
86. Donnio A, Van Nuoi DN, Guyen, Catanese M, Desbois N, Ayeboua L, Merle H. Outbreak of keratomycosis attributable to *Fusarium solani* in the French West Indies. *Am. J. Ophthalmol.* févr 2007;143(2):356-358.
87. Gaujoux T, Chatel MA, Chaumeil C, Laroche L, Borderie VM. Outbreak of contact lens-related Fusarium keratitis in France. *Cornea.* oct 2008;27(9):1018-1021.
88. Kaufmann C, Frueh BE, Messerli J, Bernauer W, Thiel MA. Contact lens-associated fusarium keratitis in Switzerland. *Klin Monbl Augenheilkd.* mai 2008;225(5):418-421.
89. Bullock JD. Root Cause Analysis of the Fusarium Keratitis Epidemic of 2004–2006 and Prescriptions for Preventing Future Epidemics. *Trans Am Ophthalmol Soc.* déc 2009;107:194-204.
90. Gower EW, Keay LJ, Oechsler RA, Iovieno A, Alfonso EC, Jones DB, et al. Trends in fungal keratitis in the United States, 2001 to 2007. *Ophthalmology.* déc 2010;117(12):2263-2267.
91. Bullock JD. Use of the poisson probability mass function in a retrospective evaluation of the worldwide Fusarium keratitis epidemic of 2004-2006. *Cornea.* oct 2008;27(9):1013-1017.

92. Levy B, Heiler D, Norton S. Report on testing from an investigation of fusarium keratitis in contact lens wearers. *Eye Contact Lens*. déc 2006;32(6):256-261.
93. O'Donnell K, Sarver BAJ, Brandt M, Chang DC, Noble-Wang J, Park BJ, et al. Phylogenetic Diversity and Microsphere Array-Based Genotyping of Human Pathogenic Fusaria, Including Isolates from the Multistate Contact Lens-Associated U.S. Keratitis Outbreaks of 2005 and 2006. *J Clin Microbiol*. juill 2007;45(7):2235-2248.
94. Elder BL, Bullock JD, Warwar RE, Khamis HJ, Khalaf SZ. Pan-Antimicrobial Failure of Alexidine as a Contact Lens Disinfectant When Heated in Bausch & Lomb Plastic Containers: Implications for the Worldwide Fusarium Keratitis Epidemic of 2004 to 2006. *Eye & contact lens* [Internet]. 9 avr 2012 [cité 13 juin 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22495680>
95. Boost M, Lai S, Ma C, Cho P. Do multipurpose contact lens disinfecting solutions work effectively against non-FDA/ISO recommended strains of bacteria and fungi? *Ophthalmic and Physiological Optics*. janv 2010;30(1):12-19.
96. Nakamura Y, Xu X, Saito Y, Tateishi T, Takahashi T, Kawachi Y, et al. Deep cutaneous infection by *Fusarium solani* in a healthy child: Successful treatment with local heat therapy. *Journal of the American Academy of Dermatology*. mai 2007;56(5):873-877.
97. Pai R, Bolor R, Shreevidya K, Shenoy D. *Fusarium solani*: An Emerging Fungus in Chronic Diabetic Ulcer. *J Lab Physicians*. janv 2010;2(1):37-39.
98. Cocuroccia B, Gaido J, Gubinelli E, Annessi G, Girolomoni G. Localized cutaneous hyalohyphomycosis caused by a *Fusarium* species infection in a renal transplant patient. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(2):905-7.
99. Pérez-Pérez L, Jr. M, Sánchez-Aguilar D, Toribio J. Ulcerous Lesions Disclosing Cutaneous Infection with *Fusarium solani*. *Acta Dermato-Venereologica*. 2007;87(5):422-424.
100. Latenser BA. *Fusarium* infections in burn patients: a case report and review of the literature. *J Burn Care Rehabil*. oct 2003;24(5):285-288.
101. Terada M, Fujita J, Watanabe S, Kawasaki M, Tanabe H, Anzawa K, et al. Olecranon bursa with *Fusarium solani* infection in an otherwise healthy patient. *Mycoses*. nov 2011;54(6):e853-855.
102. Kurien M, Anandi V, Raman R, Brahmadathan KN. Maxillary sinus fusariosis in immunocompetent hosts. *J Laryngol Otol*. août 1992;106(8):733-736.

103. Steinberg GK, Britt RH, Enzmann DR, Finlay JL, Arvin AM. Fusarium brain abscess. Case report. *J. Neurosurg.* avr 1983;58(4):598-601.
104. Anandi V, Vishwanathan P, Sasikala S, Rangarajan M, Subramaniyan CS, Chidambaram N. Fusarium solani breast abscess. *Indian J Med Microbiol.* juill 2005;23(3):198-199.
105. Sierra-Hoffman M, Paltiyevich-Gibson S, Carpenter JL, Hurley DL. Fusarium osteomyelitis: case report and review of the literature. *Scand. J. Infect. Dis.* 2005;37(3):237-240.
106. Su C-C, Hsu H-J, Wu J-J, Chou C-W. Diagnosis of fusariosis in urine cytology. *J. Clin. Pathol.* avr 2007;60(4):422-424.
107. Honraet K, De Vos MM, Summerbell RC, Van Kempen I, De Saeger S, Vermeersch H, et al. Recurrent colonization of successively implanted tracheoesophageal vocal prostheses by a member of the Fusarium solani species complex. *Journal of clinical microbiology.* 2005;43(2):770-7.
108. Cho CT, Vats TS, Lowman JT, Brandsberg JW, Tosh FE. Fusarium solani infection during treatment for acute leukemia. *J. Pediatr.* déc 1973;83(6):1028-1031.
109. Aquino VR, Verçosa EB, Falhauber G, Lunardi LW, Silla L, Pasqualotto AC. Distribution of filamentous fungi causing invasive fungal disease at the haematological unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Brazil. *Brazilian Journal of Infectious Diseases.* 2010;14(3):277-80.
110. Pagano L, Caira M, Candoni A, Offidani M, Fianchi L, Martino B, et al. The epidemiology of fungal infections in patients with hematologic malignancies: the SEIFEM-2004 study. *Haematologica.* août 2006;91(8):1068-1075.
111. Hsiue HC, Ruan SY, Kuo YL, Huang YT, Hsueh PR. Invasive infections caused by non-Aspergillus moulds identified by sequencing analysis at a tertiary care hospital in Taiwan, 2000–2008. *Clinical Microbiology and Infection.* 2010;16(8):1204-6.
112. Capoor MR, Gupta S, Sarabahi S, Mishra A, Tiwari VK, Aggarwal P. Epidemiological and clinico-mycological profile of fungal wound infection from largest burn centre in Asia. *Mycoses.* mars 2012;55(2):181-188.
113. Lodato F, Tamé MR, Montagnani M, Sambri V, Liguori G, Azzaroli F, et al. Systemic fungemia and hepatic localizations of Fusarium solani in a liver transplanted patient: An emerging fungal agent. *Liver Transplantation.* nov 2006;12(11):1711-1714.

114. Nucci M, Marr KA, Queiroz-Telles F, Martins CA, Trabasso P, Costa S, et al. Fusarium infection in hematopoietic stem cell transplant recipients. *Clin. Infect. Dis.* 1 mai 2004;38(9):1237-1242.
115. Guarro J, Nucci M, Akiti T, Gené J. Mixed Infection Caused by Two Species of Fusarium in a Human Immunodeficiency Virus-Positive Patient. *Journal of clinical microbiology.* 2000;38(9):3460-2.
116. Busemann C, Krüger W, Schwesinger G, Kallinich B, Schröder G, Abel P, et al. Myocardial and aortal involvement in a case of disseminated infection with *Fusarium solani* after allogeneic stem cell transplantation: report of a case. *Mycoses.* juill 2009;52(4):372-376.
117. Jensen TG, Gahrn-Hansen B, Arendrup M, Bruun B. Fusarium fungaemia in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Infect.* juin 2004;10(6):499-501.
118. Jossi M, Ambrosioni J, Macedo-Vinas M, Garbino J. Invasive fusariosis with prolonged fungemia in a patient with acute lymphoblastic leukemia: case report and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases.* 2010;14(4):e354-e356.
119. Labois A, Gray C, Lepretre S. Successful treatment of disseminated fusariosis with voriconazole in an acute lymphoblastic leukaemia patient. *Mycoses.* 2011;54:8-11.
120. Kontoyiannis DP, Bodey GP, Hanna H, Hachem R, Boktour M, Girgaway E, et al. Outcome determinants of fusariosis in a tertiary care cancer center: the impact of neutrophil recovery. *Leuk. Lymphoma.* janv 2004;45(1):139-141.
121. Campo M, Lewis RE, Kontoyiannis DP. Invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies at a cancer center: 1998-2009. *J. Infect.* mai 2010;60(5):331-337.
122. Jensen HE, Salonen J, Ekfors TO. The use of immunohistochemistry to improve sensitivity and specificity in the diagnosis of systemic mycoses in patients with haematological malignancies. *J. Pathol.* janv 1997;181(1):100-105.
123. Montone KT. Differentiation of *Fusarium* From *Aspergillus* Species by Colorimetric In Situ Hybridization in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Sections Using Dual Fluorogenic-Labeled LNA Probes. *American Journal of Clinical Pathology.* 18 nov 2009;132(6):866-870.
124. Sangoi AR, Rogers WM, Longacre TA, Montoya JG, Baron EJ, Banaei N. Challenges and pitfalls of morphologic identification of fungal infections in histologic and cytologic

specimens: a ten-year retrospective review at a single institution. *Am. J. Clin. Pathol.* mars 2009;131(3):364-375.

125. C. H, C. R, T. C, M. T, T. A, J. C, et al. Comparison of Aerobic Standard Medium with Specific Fungal Medium for Detecting *Fusarium* Spp. in Blood Cultures. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*. 1 oct 2002;21(10):748-750.

126. Van Burik JA, Myerson D, Schreckhise RW, Bowden RA. Panfungal PCR assay for detection of fungal infection in human blood specimens. *J. Clin. Microbiol.* mai 1998;36(5):1169-1175.

127. Hue FX, Huerre M, Rouffault MA, De Bievre C. Specific detection of *Fusarium* species in blood and tissues by a PCR technique. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(8):2434-8.

128. Lau A, Chen S, Sorrell T, Carter D, Malik R, Martin P, et al. Development and clinical application of a panfungal PCR assay to detect and identify fungal DNA in tissue specimens. *J. Clin. Microbiol.* févr 2007;45(2):380-385.

129. Ahmad S, Khan ZU, Theyyathel AM. Development of a nested PCR assay for the detection of *Fusarium solani* DNA and its evaluation in the diagnosis of invasive fusariosis using an experimental mouse model. *Mycoses*. janv 2010;53(1):40-47.

130. Campa D, Tavanti A, Gemignani F, Mogavero CS, Bellini I, Bottari F, et al. DNA Microarray Based on Arrayed-Primer Extension Technique for Identification of Pathogenic Fungi Responsible for Invasive and Superficial Mycoses. *Journal of Clinical Microbiology*. 26 déc 2007;46(3):909-915.

131. Landlinger C, Preuner S, Willinger B, Haberpursch B, Racil Z, Mayer J, et al. Species-Specific Identification of a Wide Range of Clinically Relevant Fungal Pathogens by Use of Luminex xMAP Technology. *Journal of Clinical Microbiology*. 25 févr 2009;47(4):1063-1073.

132. Odabasi Z, Mattiuzzi G, Estey E, Kantarjian H, Saeki F, Ridge RJ, 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.* 15 juill 2004;39(2):199-205.

133. De Pauw B, Walsh TJ, Donnelly JP, Stevens DA, Edwards JE, Calandra T, et al. Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin. Infect. Dis.* 15 juin 2008;46(12):1813-1821.

134. Bellanger A-P, Grenouillet F, Henon T, Skana F, Legrand F, Deconinck E, et al. Retrospective assessment of β -D-(1,3)-glucan for presumptive diagnosis of fungal infections. *APMIS*. avr 2011;119(4-5):280-286.
135. Seyfarth F, Ziemer M, Sayer HG, Burmester A, Erhard M, Welker M, et al. The use of ITS DNA sequence analysis and MALDI-TOF mass spectrometry in diagnosing an infection with *Fusarium proliferatum*. *Exp. Dermatol.* nov 2008;17(11):965-971.
136. Tortorano AM, Esposto MC, Prigitano A, Grancini A, Ossi C, Cavanna C, et al. Cross-reactivity of *Fusarium* spp. in the *Aspergillus* Galactomannan enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* mars 2012;50(3):1051-1053.
137. Marom EM, Holmes AM, Bruzzi JF, Truong MT, O'Sullivan PJ, Kontoyiannis DP. Imaging of pulmonary fusariosis in patients with hematologic malignancies. *AJR Am J Roentgenol.* juin 2008;190(6):1605-1609.
138. Oechsler RA, Feilmeier MR, Ledee DR, Miller D, Diaz MR, Fini ME, et al. Utility of molecular sequence analysis of the ITS rRNA region for identification of *Fusarium* spp. from ocular sources. *Investigative ophthalmology & visual science.* 2009;50(5):2230-6.
139. Balajee SA, Borman AM, Brandt ME, Cano J, Cuenca-Estrella M, Dannaoui E, et al. Sequence-based identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* species in the clinical mycology laboratory: where are we and where should we go from here? *J. Clin. Microbiol.* avr 2009;47(4):877-884.
140. Chandra NS, Wulff EG, Udayashankar AC, Nandini BP, Niranjana SR, Mortensen CN, et al. Prospects of molecular markers in *Fusarium* species diversity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* juin 2011;90(5):1625-1639.
141. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzon A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL. Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 4 févr 2008;61(4):805-809.
142. O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Sarver BAJ, Balajee SA, Schroers H-J, et al. Internet-Accessible DNA Sequence Database for Identifying *Fusaria* from Human and Animal Infections. *Journal of Clinical Microbiology.* 4 août 2010;48(10):3708-3718.
143. Wang H, Xiao M, Kong F, Chen S, Dou H-T, Sorrell T, et al. Accurate and Practical Identification of 20 *Fusarium* Species by Seven-Locus Sequence Analysis and Reverse Line Blot Hybridization, and an In Vitro Antifungal Susceptibility Study. *Journal of Clinical Microbiology.* 9 mars 2011;49(5):1890-1898.

144. Suga H, Ikeda S, Taga M, Kageyama K, Hyakumachi M. Electrophoretic karyotyping and gene mapping of seven formae speciales in *Fusarium solani*. *Current Genetics*. 1 juill 2002;41(4):254-260.
145. Godoy P, Cano J, Gené J, Guarro J, Höfling-Lima AL, Colombo AL. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. *Journal of clinical microbiology*. 2004;42(10):4494-7.
146. Jureen R, Tse Koh GW, Chai L, Tan A, Chai T, Wong Y, et al. Use of multiple methods for genotyping *Fusarium* during an outbreak of contact lens associated fungal keratitis in Singapore. *BMC infectious diseases*. 2008;8(1):92.
147. Debourgogne A, Gueidan C, Hennequin C, Contet-Audonneau N, De Hoog S, Machouart M. Development of a new MLST scheme for differentiation of *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) isolates. *J. Microbiol. Methods*. sept 2010;82(3):319-323.
148. Debourgogne A, Gueidan C, De Hoog S, Lozniewski A, Machouart M. Comparison of two DNA sequence-based typing schemes for the *Fusarium solani* Species Complex and proposal of a new consensus method. *Journal of microbiological methods* [Internet]. 17 juill 2012 [cité 28 juill 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22820199>
149. O'Donnell K, Gueidan C, Sink S, Johnston PR, Crous PW, Glenn A, et al. A two-locus DNA sequence database for typing plant and human pathogens within the *Fusarium oxysporum* species complex. *Fungal Genet. Biol.* déc 2009;46(12):936-948.
150. Migheli Q, Balmas V, Harak H, Sanna S, Scherm B, Aoki T, et al. Molecular Phylogenetic Diversity of Dermatologic and Other Human Pathogenic Fusarial Isolates from Hospitals in Northern and Central Italy. *Journal of Clinical Microbiology*. 27 janv 2010;48(4):1076-1084.
151. Azor M, Gene J, Cano J, Guarro J. Universal In Vitro Antifungal Resistance of Genetic Clades of the *Fusarium solani* Species Complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 12 janv 2007;51(4):1500-1503.
152. Córdoba S, Rodero L, Vivot W, Abrantes R, Davel G, Vitale RG. In vitro interactions of antifungal agents against clinical isolates of *Fusarium* spp. *Int. J. Antimicrob. Agents*. févr 2008;31(2):171-174.
153. Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Head-to-head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeasts and filamentous fungi. *Antimicrob. Agents Chemother.* mars 2006;50(3):917-921.
154. Debourgogne A, De Hoog S, Lozniewski A, Machouart M. Amphotericin B and voriconazole susceptibility profiles for the *Fusarium solani* species complex: comparison

between the E-test and CLSI M38-A2 microdilution methodology. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* avr 2012;31(4):615-618.

155. Espinel-Ingroff A, Johnson E, Hockey H, Troke P. Activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B in vitro against 590 moulds from 323 patients in the voriconazole Phase III clinical studies. *J. Antimicrob. Chemother.* mars 2008;61(3):616-620.

156. Iqbal NJ, Boey A, Park BJ, Brandt ME. Determination of in vitro susceptibility of ocular *Fusarium* spp. isolates from keratitis cases and comparison of Clinical and Laboratory Standards Institute M38-A2 and E test methods. *Diagnostic microbiology and infectious disease.* 2008;62(3):348-50.

157. Paphitou NI, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick VL, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH. In vitro activities of investigational triazoles against *Fusarium* species: effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility test results. *Antimicrobial agents and chemotherapy.* 2002;46(10):3298-300.

158. Katiyar SK, Edlind TD. Role for Fks1 in the Intrinsic Echinocandin Resistance of *Fusarium solani* as Evidenced by Hybrid Expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* 2 mars 2009;53(5):1772-1778.

159. Miyazaki M, Horii T, Hata K, Watanabe N-A, Nakamoto K, Tanaka K, et al. In vitro activity of E1210, a novel antifungal, against clinically important yeasts and molds. *Antimicrob. Agents Chemother.* oct 2011;55(10):4652-4658.

160. Hata K, Horii T, Miyazaki M, Watanabe N-A, Okubo M, Sonoda J, et al. Efficacy of oral E1210, a new broad-spectrum antifungal with a novel mechanism of action, in murine models of candidiasis, aspergillosis, and fusariosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* oct 2011;55(10):4543-4551.

161. Azor M, Cano J, Gene J, Guarro J. High genetic diversity and poor in vitro response to antifungals of clinical strains of *Fusarium oxysporum*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 24 mars 2009;63(6):1152-1155.

162. Bueno JG, Martinez C, Zapata B, Sanclemente G, Gallego M, Mesa AC. In vitro activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clin. Exp. Dermatol.* août 2010;35(6):658-663.

163. Baudraz-Rosselet F, Ruffieux C, Lurati M, Bontems O, Monod M. Onychomycosis insensitive to systemic terbinafine and azole treatments reveals non-dermatophyte moulds as infectious agents. *Dermatology (Basel).* 2010;220(2):164-168.

164. Lurati M, Baudraz-Rosselet F, Vernez M, Spring P, Bontems O, Fratti M, et al. Efficacious treatment of non-dermatophyte mould onychomycosis with topical amphotericin B. *Dermatology (Basel)*. 2011;223(4):289-292.
165. Touvron G, Denis D, Doat M, Girard A, Brandely ML, Chast F, et al. Efficacité de l'amphotéricine B liposomale dans le traitement d'une kératite à *Fusarium solani* résistante. *Journal Français d'Ophthalmologie*. 2009;32(10):721-6.
166. Dong X-H, Gao W-J, He X-P. Antifungal efficacy of natamycin in experimental *fusarium solani* keratitis. *Int J Ophthalmol*. 18 avr 2012;5(2):143-146.
167. Taylan Sekeroglu H, Erdem E, Yagmur M, Gumral R, Ersoz R, Ilkit M, et al. Successful Medical Management of Recalcitrant *Fusarium solani* Keratitis: Molecular Identification and Susceptibility Patterns. *Mycopathologia* [Internet]. 15 avr 2012 [cité 7 juin 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22528742>
168. Troke P, Obenga G, Gaujoux T, Goldschmidt P, Bienvenu A-L, Cornet M, et al. The efficacy of voriconazole in 24 ocular *Fusarium* infections. *Infection* [Internet]. 21 juin 2012 [cité 25 juin 2012]; Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22718362>
169. Yavas GF, Öztürk F, Küsbeci T, Çetinkaya Z, Ermis SS, Kiraz N, et al. Antifungal efficacy of voriconazole, itraconazole and amphotericin b in experimental *fusarium solani* keratitis. *Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology*. 2 oct 2007;246(2):275-279.
170. Polizzi A, Siniscalchi C, Mastromarino A, Saccà SC. Effect of voriconazole on a corneal abscess caused by *fusarium*. *Acta Ophthalmol Scand*. déc 2004;82(6):762-764.
171. Das S, Suresh PK, Desmukh R. Design of Eudragit RL 100 nanoparticles by nanoprecipitation method for ocular drug delivery. *Nanomedicine*. avr 2010;6(2):318-323.
172. Behrens-Baumann W, Seibold M, Hofmüller W, Walter S, Haeberle H, Wecke T, et al. Benefit of Polyhexamethylene Biguanide in *Fusarium* Keratitis. *Ophthalmic Research*. 2012;48(4):171-176.
173. Mahmoud YAG. In vitro and in vivo antifungal activity of cetrime (cetyltrimethyl ammonium bromide) against fungal keratitis caused by *Fusarium solani*. *Mycoses*. 2007;50(1):64-70.
174. Lin HC, Chu PH, Kuo YH, Shen SC. Clinical experience in managing *Fusarium solani* keratitis. *International journal of clinical practice*. 2005;59(5):549-54.

175. Muhammed M, Coleman JJ, Carneiro HA, Mylonakis E. The challenge of managing fusariosis. *Virulence*. avr 2011;2(2):91-96.
176. Perfect JR. Treatment of non-Aspergillus moulds in immunocompromised patients, with amphotericin B lipid complex. *Clin. Infect. Dis.* 1 mai 2005;40 Suppl 6:S401-408.
177. Perfect JR, Marr KA, Walsh TJ, Greenberg RN, DuPont B, De la Torre-Cisneros J, et al. Voriconazole treatment for less-common, emerging, or refractory fungal infections. *Clin. Infect. Dis.* 1 mai 2003;36(9):1122-1131.
178. Raad II, Hachem RY, Herbrecht R, Graybill JR, Hare R, Corcoran G, et al. Posaconazole as salvage treatment for invasive fusariosis in patients with underlying hematologic malignancy and other conditions. *Clin. Infect. Dis.* 15 mai 2006;42(10):1398-1403.
179. Guzman-Cottrill JA, Zheng X, Chadwick EG. *Fusarium solani* endocarditis successfully treated with liposomal amphotericin B and voriconazole. *Pediatr. Infect. Dis. J.* nov 2004;23(11):1059-1061.
180. Dotis J, Simitsopoulou M, Dalakiouridou M, Konstantinou T, Panteliadis C, Walsh TJ, et al. Amphotericin B formulations variably enhance antifungal activity of human neutrophils and monocytes against *Fusarium solani*: comparison with *Aspergillus fumigatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* avr 2008;61(4):810-817.
181. Lamarinis GA, Lewis RE, Chamilos G, May GS, Safdar A, Walsh TJ, et al. Caspofungin-mediated beta-glucan unmasking and enhancement of human polymorphonuclear neutrophil activity against *Aspergillus* and non-*Aspergillus* hyphae. *J. Infect. Dis.* 15 juill 2008;198(2):186-192.
182. Kawashima N, Yoshida N, Matsushita N, Ito M, Matsumoto K, Kato K. Intra-articular injection of voriconazole for *Fusarium solani* arthritis after bone marrow transplantation. *Journal of Infection* [Internet]. juin 2012 [cité 14 juill 2012]; Disponible sur: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445312001582>
183. Van Belkum A, Tassios PT, Dijkshoorn L, Haeggman S, Cookson B, Fry NK, et al. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clinical Microbiology and Infection.* 2007;13(s3):1-46.
184. Mahfooz S, Maurya DK, Srivastava AK, Kumar S, Arora DK. A comparative in silico analysis on frequency and distribution of microsatellites in coding regions of three formae speciales of *Fusarium oxysporum* and development of EST-SSR markers for polymorphism studies. *FEMS Microbiol. Lett.* mars 2012;328(1):54-60.

185. Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, et al. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(6):3140-5.
186. Bounoux ME, Morand S, D'Enfert C. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *Journal of clinical microbiology*. 2002;40(4):1290-7.
187. Dodgson AR, Pujol C, Denning DW, Soll DR, Fox AJ. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *Journal of clinical microbiology*. 2003;41(12):5709-17.
188. Tavanti A, Davidson AD, Johnson EM, Maiden MCJ, Shaw DJ, Gow NAR, et al. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(11):5593-600.
189. Jacobsen MD, Gow NAR, Maiden MCJ, Shaw DJ, Odds FC. Strain Typing and Determination of Population Structure of *Candida krusei* by Multilocus Sequence Typing. *Journal of Clinical Microbiology*. 22 nov 2006;45(2):317-323.
190. Feng X, Yao Z, Ren D, Liao W, Wu J. Genotype and mating type analysis of *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii* isolates from China that mainly originated from non-HIV-infected patients. *FEMS Yeast Res*. sept 2008;8(6):930-938.
191. Litvintseva AP. Multilocus Sequence Typing Reveals Three Genetic Subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A), Including a Unique Population in Botswana. *Genetics*. 15 déc 2005;172(4):2223-2238.
192. Meyer W, Aanensen DM, Boekhout T, Cogliati M, Diaz MR, Esposto MC, et al. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med. Mycol*. 2009;47(6):561-570.
193. Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NAR, et al. Multilocus Sequence Typing of the Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Clinical Microbiology*. 21 mars 2007;45(5):1469-1477.
194. Tippmann H-F. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Brief. Bioinformatics*. mars 2004;5(1):82-87.

195. Hunter PR, Gaston MA. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* nov 1988;26(11):2465-2466.
196. Struelens MJ. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* août 1996;2(1):2-11.
197. Stamatakis A, Ludwig T, Meier H. RAxML-III: a fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics.* 15 févr 2005;21(4):456-463.
198. Stamatakis A, Hoover P, Rougemont J. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML Web servers. *Syst. Biol.* oct 2008;57(5):758-771.
199. Ha Y, Covert SF, Momany M. FsFKS1, the 1, 3- β -glucan synthase from the caspofungin-resistant fungus *Fusarium solani*. *Eukaryotic cell.* 2006;5(7):1036-42.
200. Becher R, Hettwer U, Karlovsky P, Deising HB, Wirsal SGR. Adaptation of *Fusarium graminearum* to tebuconazole yielded descendants diverging for levels of fitness, fungicide resistance, virulence, and mycotoxin production. *Phytopathology.* 2010;100(5):444-53.
201. Becher R, Weihmann F, Deising HB, Wirsal SG. Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. *BMC Genomics.* 2011;12:52.
202. Liu X, Jiang J, Shao J, Yin Y, Ma Z. Gene transcription profiling of *Fusarium graminearum* treated with an azole fungicide tebuconazole. *Applied microbiology and biotechnology.* 2010;85(4):1105-14.
203. Liu X, Yu F, Schnabel G, Wu J, Wang Z, Ma Z. Paralogous *cyp51* genes in *Fusarium graminearum* mediate differential sensitivity to sterol demethylation inhibitors. *Fungal Genetics and Biology.* 2011;48(2):113-23.
204. Camps SMT, Dutilh BE, Arendrup MC, Rijs AJMM, Snelders E, Huynen MA, et al. Discovery of a hapE Mutation That Causes Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* through Whole Genome Sequencing and Sexual Crossing. *PLoS ONE.* 2012;7(11):e50034.
205. Rex JH, Clinical and Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
206. Espinel-Ingroff A. Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *Journal of clinical microbiology.* 2001;39(4):1360-7.

207. Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Costa-de-Oliveira S, Ricardo E, Maardh PA. Potent synergic effect between ibuprofen and azoles on *Candida* resulting from blockade of efflux pumps as determined by FUN-1 staining and flow cytometry. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2005;56(4):678-85.
208. Pinto e Silva AT, Costa-de-Oliveira S, Silva-Dias A, Pina-Vaz C, Rodrigues AG. Dynamics of in vitro acquisition of resistance by *Candida parapsilosis* to different azoles. *FEMS yeast research*. 2009;9(4):626-33.
209. Guinea J, Sánchez-Somolinos M, Cuevas O, Peláez T, Bouza E. Fluconazole resistance mechanisms in *Candida krusei*: the contribution of efflux-pumps. *Med. Mycol. sept* 2006;44(6):575-578.
210. Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Nangia S, Rex JH. Microdilution Susceptibility Testing of Amphotericin B, Itraconazole, and Voriconazole against Clinical Isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* Species. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(12):3946-51.
211. Tortorano AM, Prigitano A, Dho G, Esposto MC, Gianni C, Grancini A, et al. Species Distribution and In Vitro Antifungal Susceptibility Patterns of 75 Clinical Isolates of *Fusarium* spp. from Northern Italy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 28 avr 2008;52(7):2683-2685.
212. Szekely A, Johnson EM, Warnock DW. Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *Journal of clinical microbiology*. 1999;37(5):1480-3.
213. Nascimento AM, Goldman GH, Park S, Marras SAE, Delmas G, Oza U, et al. Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2003;47(5):1719-26.
214. Buied A, Moore CB, Denning DW, Bowyer P. High-level expression of *cyp51B* in azole-resistant clinical *Aspergillus fumigatus* isolates. *J. Antimicrob. Chemother.* 2 déc 2012;
215. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Cuenca-Estrella M, Sanglard D. Probing the role of point mutations in the *cyp 51A* gene from *Aspergillus fumigatus* in the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Medical Mycology*. 2011;49(3):276-84.
216. Frandsen RJ, Frandsen M, Giese H. Targeted gene replacement in fungal pathogens via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. *Methods Mol Biol*. 2012;835:17-45.

217. Frandsen RJN. A guide to binary vectors and strategies for targeted genome modification in fungi using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation. *Journal of microbiological methods*. 2011;87(3):247-62.

ANNEXES

Annexe 1 : Référence GenBank des loci séquencés lors du développement du schéma de MLST

Référence CBS	Locus				
	ACC	ICL	GDP	MDP	SOD
124633	HM804644	HM804695	HM804593	HM804746	HM804797
124894	HM804645	HM804696	HM804594	HM804747	HM804798
124632	HM804646	HM804697	HM804595	HM804748	HM804799
124901	HM804647	HM804698	HM804596	HM804749	HM804800
124631	HM804648	HM804699	HM804597	HM804750	HM804801
124630	HM804649	HM804700	HM804598	HM804751	HM804802
124629	HM804650	HM804701	HM804599	HM804752	HM804803
124895	HM804651	HM804702	HM804600	HM804753	HM804804
124896	HM804652	HM804703	HM804601	HM804754	HM804805
124628	HM804653	HM804704	HM804602	HM804755	HM804806
124623	HM804654	HM804705	HM804603	HM804756	HM804807
124889	HM804655	HM804706	HM804604	HM804757	HM804808

124627	HM804656	HM804707	HM804605	HM804758	HM804809
124890	HM804657	HM804708	HM804606	HM804759	HM804810
124897	HM804658	HM804709	HM804607	HM804760	HM804811
124891	HM804659	HM804710	HM804608	HM804761	HM804812
124898	HM804660	HM804711	HM804609	HM804762	HM804813
124892	HM804661	HM804712	HM804610	HM804763	HM804814
124899	HM804662	HM804713	HM804611	HM804764	HM804815
124893	HM804663	HM804714	HM804612	HM804765	HM804816
124900	HM804664	HM804715	HM804613	HM804766	HM804817
124626	HM804665	HM804716	HM804614	HM804767	HM804818
125013	HM804666	HM804717	HM804615	HM804768	HM804819
124625	HM804667	HM804718	HM804616	HM804769	HM804820
124624	HM804668	HM804719	HM804617	HM804770	HM804821
102824	HM804669	HM804720	HM804618	HM804771	HM804822
241.93	HM804670	HM804721	HM804619	HM804772	HM804823
115695	HM804671	HM804722	HM804620	HM804773	HM804824

208.29	HM804672	HM804723	HM804621	HM804774	HM804825
181.29	HM804673	HM804724	HM804622	HM804775	HM804826
119996	HM804674	HM804725	HM804623	HM804776	HM804827
119223	HM804675	HM804726	HM804624	HM804777	HM804828
118931	HM804676	HM804727	HM804625	HM804778	HM804829
117481	HM804677	HM804728	HM804626	HM804779	HM804830
115659	HM804678	HM804729	HM804627	HM804780	HM804831
165.87	HM804679	HM804730	HM804628	HM804781	HM804832
318.73	HM804680	HM804731	HM804629	HM804782	HM804833
222.49	HM804681	HM804732	HM804630	HM804783	HM804834
231.31	HM804682	HM804733	HM804631	HM804784	HM804835
121450	HM804683	HM804734	HM804632	HM804785	HM804836
115660	HM804684	HM804735	HM804633	HM804786	HM804837
115658	HM804685	HM804736	HM804634	HM804787	HM804838
115045	HM804686	HM804737	HM804635	HM804788	HM804839
166.87	HM804687	HM804738	HM804636	HM804789	HM804840

109028	HM804688	HM804739	HM804637	HM804790	HM804841
108942	HM804689	HM804740	HM804638	HM804791	HM804842
490.63	HM804690	HM804741	HM804639	HM804792	HM804843
224.34	HM804691	HM804742	HM804640	HM804793	HM804844
112100	HM804692	HM804743	HM804641	HM804794	HM804845
117608	HM804693	HM804744	HM804642	HM804795	HM804846
116746	HM804694	HM804745	HM804643	HM804796	HM804847

Annexe 2 : Référence GenBank des loci utilisés en phylogénie ou séquencés (en gras) lors de la comparaison des schémas de typage

Espèces	Référence	EF1a	ITS-nuLSU	RPB2
FSSC	NRRL 20438	AF178332	AF178397 - AF178366	EU329487
FSSC	NRRL 22090	AF178326	AF178393 - AF178362	EU329488
FSSC	NRRL 22098	AF178327	DQ094301 - DQ236343	EU329489
FSSC	NRRL 22101	AF178333	AF178398 - AF178367	EU329490
FSSC	NRRL 22153	AF178346	DQ094302 - DQ236344	EU329492
FSSC	NRRL 22157	AF178359	DQ094306 - DQ236348	EU329493
FSSC	NRRL 22161	AF178330	DQ094311 - DQ236353	EU329494
FSSC	NRRL 22163	AF178328	AF178394 - AF178363	EU329496
FSSC	NRRL 22166	AF178350	DQ094319 - DQ236361	EU329497
FSSC	NRRL 22178	AF178334	AF178399 - AF178368	EU329498
FSSC	NRRL 22230	AF178358	AF178420 - AF178389	EU329499
FSSC	NRRL 22278	AF178337	DQ094309 - DQ236351	EU329501
FSSC	NRRL 22346	FJ240350	EU329669	EU329503
FSSC	NRRL 22354	AF178338	AF178402 - AF178371	EU329504
FSSC	NRRL 22387	AF178339	AF178403 - AF178372	EU329505
FSSC	NRRL 22389	AF178340	AF178404 - AF178373	EU329506
FSSC	NRRL 22395	AF178341	AF178405 - AF178374	EU329507
FSSC	NRRL 22396	AF178342	AF178406 - AF178375	EU329508
FSSC	NRRL 22400	AF178343	AF178407 - AF178376	EU329509
FSSC	NRRL 22412	AF178351	AF178414 - AF178383	EU329510
FSSC	NRRL 22436	AF178348	AF178412 - AF178381	EU329511
FSSC	NRRL 22570	AF178360	AF178422 - AF178391	EU329513
FSSC	NRRL 22574	AF178345	AF178409 - AF178378	EU329514
FSSC	NRRL 22579	AF178352	AF178415 - AF178384	EU329515
FSSC	NRRL 22608	DQ246838	DQ094323 - DQ236365	EU329517
FSSC	NRRL 22632	AF178354	AF178417 - AF178386	EU329519
FSSC	NRRL 22661	DQ246846	DQ094331 - DQ236373	EU329524
FSSC	NRRL 22781	DQ246849	DQ094334 - DQ236376	EU329527
FSSC	NRRL 22782	DQ246850	EU329670	EU329528
FSSC	NRRL 22825	AF178357	AF178419 - AF178388	EU329533
FSSC	NRRL 25388	DQ246858	DQ094341 - DQ236383	EU329535
FSSC	NRRL 25726	DQ246863	DQ094345 - DQ236387	EU329539
FSSC	NRRL 28000	DQ246865	DQ094347 - DQ236389	EF470128
FSSC	NRRL 28008	DQ246868	DQ094350 - DQ236392	EF470135
FSSC	NRRL 28009	DQ246869	DQ094351 - DQ236393	EF470136
FSSC	NRRL 28016	DQ246873	EU329673	EF470140
FSSC	NRRL 28030	DQ246877	DQ094355 - DQ236397	EF470146
FSSC	NRRL 28541	DQ246882	EU329674	EU329542
FSSC	NRRL 28546	DQ246887	DQ094361 - DQ236403	EU329544
FSSC	NRRL 28548	DQ246889	DQ094363 - DQ236405	EU329545
FSSC	NRRL 28679	DQ246912	DQ094385 - DQ236427	EU329556
FSSC	NRRL 31096	EF408418	GU170656	EU329557

FSSC	NRRL 31158	DQ246916	DQ094389 - DQ236431	EU329559
FSSC	NRRL 32301	DQ246929	EU329677	EU329567
FSSC	NRRL 31165	DQ246921	DQ094394 - DQ236436	EU329562
FSSC	NRRL 31168	DQ246922	DQ094395 - DQ236437	EU329563
FSSC	NRRL 31169	DQ246923	DQ094396 - DQ236438	EU329564
FSSC	NRRL 32304	DQ246932	DQ094402 - DQ236444	EU329568
FSSC	NRRL 32317	DQ246945	DQ094414 - DQ236456	EU329575
FSSC	NRRL 32323	DQ246951	DQ094420 - DQ236462	EU329576
FSSC	NRRL 32437	DQ246979	DQ094446 - DQ236488	EU329581
FSSC	NRRL 32710	DQ247030	DQ094492 - DQ236534	EU329596
FSSC	NRRL 32711	DQ247031	DQ094493 - DQ236535	EU329597
FSSC	NRRL 32721	DQ247041	DQ094503 - DQ236545	EU329602
FSSC	NRRL 32736	DQ247056	DQ094517 - DQ236559	EU329605
FSSC	NRRL 32741	DQ247061	DQ094522 - DQ236564	EU329608
FSSC	NRRL 32743	DQ247062	DQ094523 - DQ236565	EU329609
FSSC	NRRL 32755	DQ247073	DQ094534 - DQ236576	EU329613
FSSC	NRRL 32790	DQ247099	DQ094559 - DQ236601	EU329619
FSSC	NRRL 32791	DQ247100	DQ094560 - DQ236602	EU329620
FSSC	NRRL 32792	DQ247101	DQ094561 - DQ236603	EU329621
FSSC	NRRL 32810	DQ247118	DQ094577 - DQ236619	EU329624
FSSC	NRRL 32821	DQ247128	DQ094587 - DQ236629	EU329625
FSSC	NRRL 32849	DQ247155	EU329682	EU329628
FSSC	NRRL 32928	DQ247176	DQ094630 - DQ236672	EU329633
FSSC	NRRL 34123	DQ247192	DQ094645 - DQ236687	EU329635
FSSC	NRRL 34174	AY381145	AY381139 - AY381151	EU329636
FSSC	NRRL 37625	FJ240353	EU329684	EU329637
FSSC	NRRL 37640	FJ240355	EU329685	EU329638
FSSC	NRRL 43433	DQ790473	DQ790517	DQ790561
FSSC	NRRL 43490	DQ790485	DQ790529	DQ790573
FSSC	NRRL 43502	DQ790488	DQ790532	DQ790576
FSSC	NRRL 43717	FJ240356	EU329688	EF470233
FSSC	NRRL 43812	EF453054	EF453205	EF470093
FSSC	NRRL 46707	HM347127	EU329716	EU329665
FSSC	CBS 124633	JX435123	JX435173	JX435223
FSSC	CBS 124894	JX435124	JX435174	JX435224
FSSC	CBS 124901	JX435125	JX435175	JX435225
FSSC	CBS 124631	JX435126	JX435176	JX435226
FSSC	CBS 124630	JX435127	JX435177	JX435227
FSSC	CBS 124629	JX435128	JX435178	JX435228
FSSC	CBS 124895	JX435129	JX435179	JX435229
FSSC	CBS 124896	JX435130	JX435180	JX435230
FSSC	CBS 124628	JX435131	JX435181	JX435231
FSSC	CBS 124623	JX435132	JX435182	JX435232
FSSC	CBS 124889	JX435133	JX435183	JX435233
FSSC	CBS 124627	JX435134	JX435184	JX435234
FSSC	CBS 124890	JX435135	JX435185	JX435235
FSSC	CBS 124897	JX435136	JX435186	JX435236
FSSC	CBS 124891	JX435137	JX435187	JX435237

FSSC	CBS 124898	JX435138	JX435188	JX435238
FSSC	CBS 124892	JX435139	JX435189	JX435239
FSSC	CBS 124899	JX435140	JX435190	JX435240
FSSC	CBS 124893	JX435141	JX435191	JX435241
FSSC	CBS 124900	JX435142	JX435192	JX435242
FSSC	CBS 124626	JX435143	JX435193	JX435243
FSSC	CBS 125013	JX435144	JX435194	JX435244
FSSC	CBS 124625	JX435145	JX435195	JX435245
FSSC	CBS 124624	JX435146	JX435196	JX435246
FSSC	CBS 102824	JX435147	JX435197	JX435247
FSSC	CBS 241.93	JX435148	JX435198	JX435248
FSSC	CBS 115695	JX435149	JX435199	JX435249
FSSC	CBS 208.29	JX435150	JX435200	JX435250
FSSC	CBS 181.29	JX435151	JX435201	JX435251
FSSC	CBS 119996	JX435152	JX435202	JX435252
FSSC	CBS 119223	JX435153	JX435203	JX435253
FSSC	CBS 118931	JX435154	JX435204	JX435254
FSSC	CBS 117481	JX435155	JX435205	JX435255
FSSC	CBS 115659	JX435156	JX435206	JX435256
FSSC	CBS 165.87	JX435157	JX435207	JX435257
FSSC	CBS 318.73	JX435158	JX435208	JX435258
FSSC	CBS 222.49	JX435159	JX435209	JX435259
FSSC	CBS 231.31	JX435160	JX435210	JX435260
FSSC	CBS 121450	JX435161	JX435211	JX435261
FSSC	CBS 115660	JX435162	JX435212	JX435262
FSSC	CBS 115658	JX435163	JX435213	JX435263
FSSC	CBS 115045	JX435164	JX435214	JX435264
FSSC	CBS 166.87	JX435165	JX435215	JX435265
FSSC	CBS 109028	JX435166	JX435216	JX435266
FSSC	CBS 108942	JX435167	JX435217	JX435267
FSSC	CBS 490.63	JX435168	JX435218	JX435268
FSSC	CBS 224.34	JX435169	JX435219	JX435269
FSSC	CBS 112100	JX435170	JX435220	JX435270
FSSC	CBS 117608	JX435171	JX435221	JX435271
FSSC	CBS 116746	JX435172	JX435222	JX435272
<i>F. staphyleae</i>	NRRL 22316	AF178361	AF178423 - AF178392	EU329502