



HAL
open science

Fusarium solani, typage moléculaire et mécanisme d'adaptation à son environnement

Anne Debourgogne

► **To cite this version:**

Anne Debourgogne. Fusarium solani, typage moléculaire et mécanisme d'adaptation à son environnement. Mycologie. Université de Lorraine, 2021. tel-03124396

HAL Id: tel-03124396

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-03124396v1>

Submitted on 8 Feb 2021

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.



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE

BioSE



Mémoire

Présenté et soutenu publiquement pour l'obtention du diplôme

HABILITATION A DIRIGIER DES RECHERCHES

Mention « Sciences de la Vie et de la Santé »

par Anne DEBOURGOGNE

Fusarium solani, typage moléculaire et mécanismes d'adaptation à son environnement

20 Janvier 2021

Membres du jury :

Rapporteurs :	Madame Françoise BOTTEREL, Madame Laurence MILLON, Monsieur Jean MENOTTI,	PU-PH section 45-02 PU-PH section 45-02 MCU-PH section 45-02
Examineurs :	Monsieur Guillaume DESOUBEAUX, Monsieur Jean Pol FRIPPIAT, Madame Marie MACHOUART,	PU-PH section 45-02 PU section 68 PU-PH section 45-02
Invité :	Madame Patricia FRANCK,	PH

EA 7300 Stress Immunité et Pathogènes

Remerciements

A Madame le Professeur Françoise BOTTEREL

Pour avoir accepté sans hésitation d'être rapporteur de ce projet,

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

A Madame le Professeur Laurence MILLON

Pour avoir accepté avec enthousiasme d'être rapporteur de ce projet,

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

A Monsieur le Docteur Jean MENOTTI

Pour avoir gentiment accepté d'être à nouveau rapporteur d'une étape importante de mon projet professionnel,

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

A Monsieur le Professeur Guillaume DESOUBEAUX

Pour m'avoir permis de pouvoir tester mes nouvelles techniques sur tes requins américains et pour nos discussions de « jeunes » mycologues,

Sois assuré de ma sincère reconnaissance et de mon amitié

A Monsieur le Professeur Jean Pol FRIPPIAT

Pour m'avoir fait confiance en acceptant un versant mycologique aux problématiques étudiées par l'équipe SIMPA et pour tes conseils scientifiques

Sois assuré de ma gratitude et de mon profond respect

A Madame le Professeur Marie MACHOUART

Tu as accepté d'être mon parrain scientifique,

Sois assuré de ma sincère reconnaissance et de mon amitié

A Madame le Docteur Patricia FRANCK

Depuis quelques années, notre binôme a surtout connu « le pire », mais ici, nous partageons un évènement fort de mon parcours qui se classera dans la partie « le meilleur »

Tes connaissances, tes conseils et ta disponibilité m'ont permis de franchir de nombreuses étapes.

Sois assurée de ma sincère gratitude et de mon amitié.

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

A mes parents et mon Krikri

SOMMAIRE

<i>ETAT CIVIL ET COORDONNEES</i>	6
<i>COORDONNEES PERSONNELLES</i>	6
<i>COORDONNEES PROFESSIONNELLES</i>	6
<i>FONCTIONS ACTUELLES</i>	7
<i>CURRICULUM VITAE</i>	8
<i>DIPLOMES</i>	8
<i>FORMATIONS</i>	11
<i>CURSUS ET FONCTIONS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES</i>	12
<i>Internat CHRU de Nancy</i>	12
<i>Fonctions hospitalo-universitaires</i>	14
<i>ACTIVITES HOSPITALIERES</i>	15
<i>PRINCIPALES ACTIVITES</i>	17
<i>ACTIVITES SPECIFIQUES</i>	18
<i>ACTIVITES TRANSVERSALES</i>	20
<i>PERSPECTIVES</i>	22
<i>ACTIVITES DE RECHERCHE</i>	23
<i>THEMATIQUE DU DOCTORAT D'UNIVERSITE</i>	24
<i>EXPOSE SYNTHETIQUE DES RECHERCHES POST-DOCTORALES</i>	28
<i>Axe 1 : Typage moléculaire</i>	28
<i>Axe 2 : Antifongiques</i>	31
<i>Axe 3 : Physiologie & Stress</i>	35
<i>CONTRATS & COLLABORATIONS</i>	38
<i>PROJET DE RECHERCHE</i>	39

<i>ACTIVITES PEDAGOGIQUES</i>	45
<i>ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT</i>	45
<i>Premier cycle et Deuxième cycle des Etudes de Médecine</i>	45
<i>DES de Biologie médicale</i>	45
<i>Diplômes d'Université</i>	45
<i>Masters (Faculté des Sciences)</i>	45
<i>Ecole de Maïeutique</i>	45
<i>Enseignements Post Universitaires</i>	45
<i>ACTIVITES D'ENCADREMENTS</i>	46
<i>Stage d'initiation à la recherche</i>	46
<i>Master 1</i>	47
<i>Master 2</i>	48
<i>Thèse d'Université</i>	49
<i>Direction de Thèses de Docteur d'Etat en Pharmacie ou Médecine et mémoires de DES de Biologie médicale</i>	50
<i>Autres formations</i>	52
<i>Participation à jurys de thèses et mémoires</i>	53
<i>PERSPECTIVES</i>	55
<i>PRODUCTION SCIENTIFIQUE</i>	56
<i>PUBLICATIONS DANS DES REVUES A COMITES DE LECTURE</i>	56
<i>PUBLICATIONS DIDACTIQUES / CHAPITRE D'OUVRAGES</i>	64
<i>COMITE ÉDITORIAL</i>	65
<i>SYNTHESE</i>	66
<i>INDICATEURS</i>	68
<i>COMMUNICATIONS ORALES</i>	69
<i>CONFÉRENCES INVITÉES</i>	71
<i>COMMUNICATIONS AFFICHÉES</i>	72

<i>SOUMISSION DE SEQUENCES (GENBANK)</i>	75
<i>SOCIETES SAVANTES</i>	77
<i>RELECTEUR INVITE POUR REVUES A COMITE DE LECTURE</i>	78
<i>REFERENCES</i>	79
<i>PUBLICATIONS MAJEURES SELECTIONNEES</i>	83

ETAT CIVIL ET COORDONNEES

Anne DEBOURGOGNE

Née le 26 janvier 1981 à Langres (52)

En couple, sans enfants

COORDONNEES PERSONNELLES

COORDONNEES PROFESSIONNELLES

Laboratoire SIMPA

EA7300


Faculté de Médecine

Université de Lorraine

Bâtiment AB

9 Avenue de la Forêt de Haye

54 505 VANDOEUVRE les NANCY

 : 03.72.74.63.14

@ : anne.debourgogne@univ-lorraine.fr

Laboratoire de Microbiologie


Pôle Laboratoires

CHRU Nancy

Bâtiment de Biologie et de Biopathologie

Rue du Morvan

54 511 VANDOEUVRE les NANCY

 : 03.83.15.43.96

@ : a.debourgogne@chu-nancy.fr

FONCTIONS ACTUELLES

- *Maître de Conférences des Universités - Praticien Hospitalier*

Université de Lorraine - Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Nancy

- *Suppléante du Laboratoire de Biologie Médicale*

CHRU Nancy

- *Responsabilité du Plateau technique automatisé du nouveau Bâtiment de Biologie et de Biopathologie*

CHRU Nancy

CURRICULUM VITAE

DIPLOMES

- 1999 : *Baccalauréat Scientifique Spécialité Physique Chimie*
Mention Bien
Lycée Privée Notre Dame DIJON
- 2000 : *Concours de 1^{ère} année Pharmacie*
Classement : 45
UFR Pharmacie DIJON
- 2002 : *Certificat de Physiopathologie des Maladies Transmissibles*
UFR Médecine DIJON
- 2003 : *Maîtrise des Sciences Biologiques et Médicales*
UFR Pharmacie DIJON
- 2004 : *Concours de l'Internat en Pharmacie*
Classement : Nord : 130 - Sud : 165
- 2006 : *DIU CESAM Méthodologie & Statistiques en Biologie*
Mention Bien
Université Pierre et Marie Curie PARIS 6

- 2007 : *Module Organisation, Gestion et Droit*
UFR Pharmacie STRASBOURG
- 2008 : *Master 2 Biologie Moléculaire et Cellulaire - Parcours Parasitologie*
Mention Bien
Université Pierre et Marie Curie PARIS 6
- 2008 : *Mémoire de DES de Biologie Médicale*
Diplôme de Doctorat d'Etat en Pharmacie
« Caractérisation moléculaire de souches cliniques et végétales de Fusarium solani par MLST »
Directeur de thèse : Dr Marie Machouart
Mention Très Bien
UFR Pharmacie Nancy
- 2009 : *DU de Pathologie Tropicale*
Université Antilles Guyane
Enseignement suivi mais non validé (par indisponibilité le jour de l'examen)
- 2010 : *Cours de Mycologie Médicale de l'Institut Pasteur / DIU*
Mention Très Bien
Université Pierre et Marie Curie PARIS 6
- 2011 : *DIU Pédagogie Médicale*
Université Henri Poincaré Nancy I

- 2011 : *DIU Expérimentation Animale*

Université Henri Poincaré Nancy I

- 2013 : *Doctorat de l'Université de Lorraine*

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

Directeurs de thèse : Dr Marie Machouart & Pr Alain Lozniewski

EA 4369 Relation Hôte Environnement Micro-organismes Pr G. Faure

Devenue EA 7300 Stress Immunité Pathogène Pr J.P. Fripiat

FORMATIONS

- 2014 : *Passeport Pilotage Carrière*
Certificat en Management Avancé
Philippe Villemus

- 2014 : *Formation « Des Investigateurs à la Recherche Clinique »*
For Drug Consulting

- 2015 : *Statistiques appliquées à la recherche clinique (3 modules)*
Médiaxe Formation

- 2015 : *Enseigner avec iPad (3 modules)*
Plateforme d’Imagerie et de Biophysique Cellulaire et Tissulaire,
Université de Lorraine

- 2017 : *Microscopie confocale (3 modules théoriques + applications pratiques)*
Plateforme d’Imagerie et de Biophysique Cellulaire et Tissulaire,
Université de Lorraine

- 2019-2020 : *Formation Process Communication (3 séances)*

- 2020-2021 : *Formation Innovation managériale*
 - *Module 1 : Comportement managérial et Communication (TTI Success Insight) 1 journée*
 - *Module 2 : Management d’équipes : outils, ateliers pratiques et pédagogiques, 2 jours*
 - *Module 3 : Conduite du changement : outils, ateliers pratiques et pédagogiques, 2 jours*

CURSUS ET FONCTIONS HOSPITALO-UNIVERSITAIRES

Internat CHRU de Nancy

- Nov 2004 – Nov 2005 : *Interne en Pharmacie Hospitalière*
Dr I. May

DES Biologie Médicale niveau 1

- Nov 2005 – Mai 2006 : *Hématologie Biologique*
Pr T. Lecompte
- Mai 2006 – Nov 2006 : *Bactériologie*
Pr A. Lozniewski
- Nov 2006 – Mai 2007 : *Parasitologie Mycologie*
Pr B. Fortier
- Mai 2007 – Nov 2007 : *Biochimie – Biologie Moléculaire*
Pr J.L. Guéant

DES Biologie Médicale niveau 2

Spécialisation :

Parasitologie – Mycologie et risques environnementaux

- Nov 2007 – Mai 2008 : *Parasitologie Mycologie*
Pr B. Fortier
- Mai 2008 – Nov 2008 : *Bactériologie (Bactériologie standard et Mycobactéries)*
Pr A. Lozniewski

- *Nov 2008 – Mai 2009 : Parasitologie Mycologie (inter CHU Guyane)*

Pr B. Carmes

A souligner que cet interCHU en Guyane a donné lieu à 3 publications sur des thématiques de pathogènes exotiques [A9, A15, A24].

- *Mai 2009 – Nov 2009 : Parasitologie Mycologie*

Pr A. Lozniewski

Fonctions hospitalo-universitaires

- *Novembre 2009 – Mai 2013 :*

Assistant Hospitalo-Universitaire des Disciplines Médicales

Université de Lorraine, Faculté de Médecine – CHRU de Nancy

EA 4369 Relation Hôte Environnement Micro-organismes Pr G. Faure

devenue EA 7300 Stress Immunité Pathogènes, Pr J.P. Frippiat

Pôle Laboratoires, Pr T. Lecompte / Pr F. Plénat

Structure de Parasitologie Mycologie, responsable Pr M. Machouart

- *Mai 2013 – Septembre 2014 :*

Praticien Hospitalier Universitaire des Disciplines Médicales

Université de Lorraine, Faculté de Médecine – CHRU Nancy

EA 7300 Stress Immunité Pathogènes, Pr J.P. Frippiat

Pôle Laboratoires, Pr P. Jonveaux

Structure de Parasitologie Mycologie, responsable Pr M. Machouart

- *Depuis Septembre 2014 :*

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier

Université de Lorraine, Faculté de Médecine – CHRU de Nancy

EA 7300 Stress Immunité Pathogènes, Pr J.P. Frippiat

Pôle Laboratoires, Pr P. Jonveaux / Dr P. Franck

Structure de Parasitologie Mycologie, responsable Pr M. Machouart

Structure de Microbiologie, responsable Pr A. Lozniewski

ACTIVITES HOSPITALIERES

Le Centre Hospitalier Régional Universitaire de Nancy présente une capacité d'accueil de 1600 lits et 200 places, il est réparti sur deux sites : les hôpitaux urbains et le site de Brabois. Le pôle Laboratoires regroupe 14 laboratoires répartis sur les 2 sites. En juin 2019, un nouveau bâtiment de Biologie médicale et de Biopathologie a été construit sur le site de Brabois. Ce projet ambitieux de 8000 m² a permis de regrouper les différents laboratoires et de créer des plateformes technologiques de biologie de dernière génération.

La discipline de Parasitologie Mycologie bénéficie de trois de ces nouvelles plateformes :

- *Le plateau technique automatisé organisé autour d'une chaîne de convoyage où est réalisé l'immunodiagnostic parasitaire et fongique*
- *La plateforme de biologie moléculaire qui réalise les analyses génomiques (PCR et séquençage)*
- *Le plateau de Microbiologie qui dispose d'un ensemenceur automatique et d'étuves intelligentes en totale automation pour les recherches bactériologiques et mycologiques*

Les autres analyses de Parasitologie et Mycologie spécialisées sont réalisées au sein du plateau de Microbiologie dans des espaces dédiés. Le laboratoire dispose également d'une annexe intégrée au service de dermatologie comprenant une salle de prélèvements et une pièce technique pour la réalisation et la lecture des examens mycodermatologiques.

Le laboratoire de Microbiologie, dirigé par le Pr Alain LOZNIIEWSKI, depuis septembre 2019, regroupe les activités et les équipes de Bactériologie, Parasitologie – Mycologie, Virologie et Microbiologie environnementale. L'activité générée par les examens de Parasitologie et de Mycologie est de 3.2 millions de B/BHN par an. L'équipe de Parasitologie Mycologie, est coordonnée par le Pr Marie MACHOUART et comprend actuellement, en personnel médical, quatre postes de biologistes : un PU-PH, un MCU-PH, un AHU et un assistant spécialiste à temps partagé à 50 % ainsi qu'une vacation et un poste d'interne en biologie médicale.

L'activité de Parasitologie Mycologie se partage en 4 secteurs :

- ✓ Parasitologie
- ✓ Mycologie, qui inclut l'activité classique et celle de prélèvements dermatologiques dans les services cliniques mais aussi lors de consultations externes
- ✓ Biologie Moléculaire, mutualisée avec les autres disciplines de Microbiologie au sein de la Plateforme de Génomique Microbienne et située géographiquement avec l'ensemble des activités moléculaires des autres structures du CHRU au niveau de la Plateforme de Biologie Moléculaire
- ✓ Immunodiagnostic parasitaire et fongique, intégré au Plateau Technique Automatisé

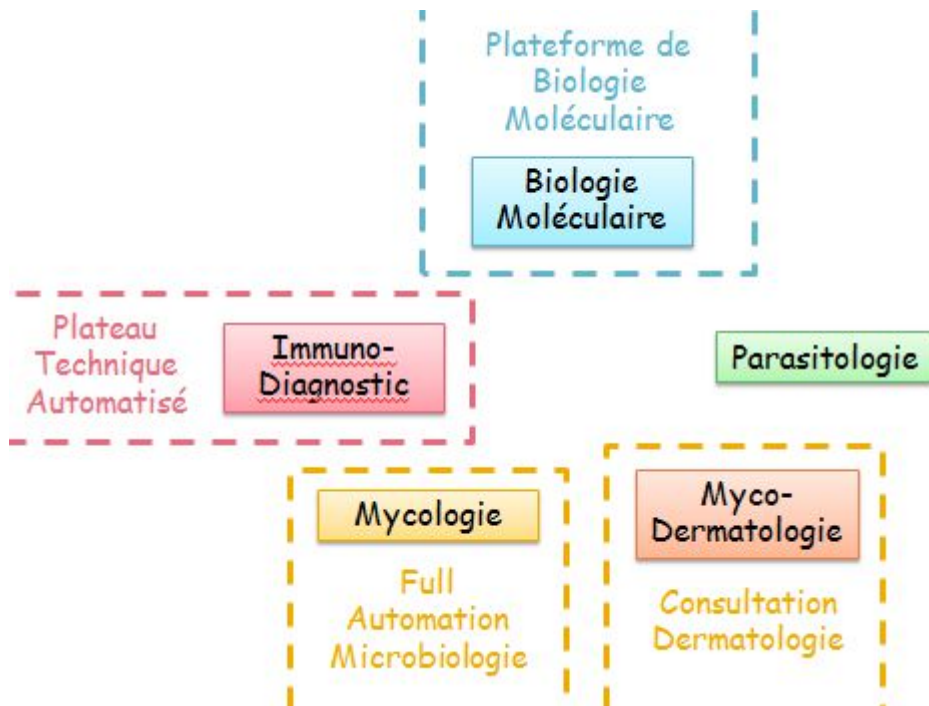


Figure 1 : Examens réalisés en Parasitologie Mycologie et au sein des différentes plateformes

PRINCIPALES ACTIVITES

Le biologiste assure, en routine, toutes les relectures, soit des examens importants et difficiles (goutte épaisse dans le diagnostic de paludisme, recherche de microfilaries, ...), soit des prélèvements positifs pour procéder à l'identification du pathogène (parasites intestinaux ou champignons filamenteux, ...).

Toutes les analyses, quel que soit le secteur, sont interprétées et validées par le biologiste. En fonction des données épidémio-clinico-biologiques du patient, le biologiste choisit la stratégie diagnostique la plus adaptée au cas présent (ajout de techniques complémentaires, confirmation par biologie moléculaire, ...).

Le biologiste en charge de la validation est l'interlocuteur privilégié de nos collègues cliniciens qui sollicitent un avis diagnostique et/ou des conseils thérapeutiques. Il doit être également vigilant aux dossiers nécessitant des déclarations aux différents groupes de travail ou Centres Nationaux de Référence.

Le biologiste assure la réalisation des prélèvements de peau et phanères au sein de la partie laboratoire couplée au service de Dermatologie.

Il participe aussi à l'encadrement des internes et du personnel technique. A cette occasion, des formations continues « à la paillasse » sont proposées mais aussi des enseignements théoriques sur les principales pathologies parasitaires et fongiques.

Enfin, le biologiste participe aux astreintes de Parasitologie Mycologie (répartition équivalente à raison de une semaine sur 2 à une semaine sur 4, en fonction des effectifs en biologistes).

ACTIVITES SPECIFIQUES

Responsabilité des examens de Parasitologie et d'Immunodiagnostic parasitaire et fongique

La responsabilité des examens a été répartie entre les deux biologistes titulaires du service. Je suis donc en charge des examens de Parasitologie et d'Immunodiagnostic parasitaire et fongique. Dans ce contexte, j'assure la veille documentaire et technologique, la rédaction de cahiers des charges, le travail de fond et de suivi, les formations autour de ces examens. De nouvelles techniques sont ainsi évaluées et ces travaux peuvent donner lieu à des valorisations scientifiques [A36, P8, P9]. Le biologiste est aussi responsable de la qualité des examens de son secteur, l'ensemble des dossiers de validation de méthode est rédigé et lors de la dernière visite COFRAC en octobre 2019, plus de 90 % des examens de ces deux domaines étaient accrédités.

Expertise pour le diagnostic de la toxoplasmose

Notre laboratoire est centre expert pour le diagnostic de la toxoplasmose auprès de la société Siemens. Cette activité compte plus de 100 dossiers d'expertises par mois.

De ce fait, je dispose de l'agrément en diagnostic prénatal pour les maladies infectieuses.

Pathologies exotiques

Mon inter-CHU en Guyane et les enseignements du DU de Pathologies Tropicales m'ont apporté une bonne expérience dans le diagnostic et la prise en charge de ces infections. Dans le service, elle est appréciable pour le diagnostic du paludisme, des filarioses, des leishmanioses et de l'histoplasmose. De ce fait, je réalise des formations régulières à la lecture de goutte épaisse pour les internes, les techniciens mais aussi les biologistes dans le cadre de formation médicale continue. Mon intérêt très marqué pour ces pathologies tropicales a été valorisé par plusieurs publications [A9, A13, A15, A17, A24] et communication [C3].

Biologie moléculaire

Les enseignements du Master 2 de Biologie Moléculaire et Cellulaire Parcours Parasitologie m'ont apporté des connaissances théoriques mises en pratique lors du stage de M2R, puis de ma thèse d'exercice et d'Université. Ceci me permet au quotidien de répondre aux interrogations des techniciens et d'optimiser les techniques en cours. Ainsi, j'ai participé à la mise en place de la PCR Plasmodium knowlesi [A7] et au diagnostic moléculaire de différentes mycoses inhabituelles [A3, A4, A5, A8, A10, A11, A18, A22, A25, A28]. Lors de mon assistanat, j'ai encadré la mise en place d'une PCR en temps réel pour le diagnostic de Pneumocystis jirovecii. Ceci a abouti à la proposition d'une nouvelle stratégie diagnostique aux cliniciens, conforme aux dernières recommandations. Un travail collaboratif avec les néphrologues a également été réalisé pour documenter une épidémie de pneumocystose grâce à une technique de MultiLocus Sequence Typing [A19] et m'a permis de participer à d'autres travaux nationaux sur cette thématique [A20, A39].

Démarche Qualité et Accréditation

Au niveau de notre équipe, je suis référente assurance qualité. Dans ce contexte, j'initie et coordonne les différents axes d'amélioration de la qualité tels que l'habilitation du personnel médical et non médical, la mise en place de contrôles internes de qualité, les validations de méthodes. Je participe aux réunions et formations organisées par le bureau qualité du pôle, ainsi qu'à la rédaction des documents qualité généraux.

De ce fait, je participe aux groupes de travail nationaux ANOFEL Accréditation et Qualité en immuno-diagnostic fongique.

Référent CNR Paludisme et Cryptosporidium

Dans le cadre des différentes déclarations à réaliser aux Centres Nationaux de Référence, je représente notre laboratoire au sein des CNR Paludisme et Cryptosporidium en gérant les cas, les bilans annuels, en assistant aux réunions annuelles et en participant aux travaux nationaux [A27, A29, A30, A34].

ACTIVITES TRANSVERSALES

Responsabilité de la plateforme d'immuno-analyse

Pendant 5 ans (jusqu'à sa fermeture suite à la réorganisation du pôle Laboratoires), j'ai assuré la coordination de la plateforme d'immuno-analyses, qui correspond à une mutualisation de locaux, matériels et personnels autour d'une même technologie : l'immunodiagnostic infectieux.

Responsabilité du processus Gestion des risques du pôle Laboratoires

En tant que responsable de ce processus qualité, j'assure la gestion de toutes les évènements indésirables relatifs au pôle Laboratoires déclarés dans le logiciel institutionnel Granit et anime les Comités de Retour d'Expertise du pôle Laboratoires et interagit avec la Direction de la Qualité et des Usagers du CHRU, notamment au sein d'une sous-commission de la CME, la CoViRis (commission de la vigilance et des risques). L'autre volet de ce processus est la gestion des risques à priori déclinée pour chaque processus mais aussi lors de modifications organisationnelles majeures, elle est revue tous les deux ans.

Participation aux groupes de travail dans le cadre du projet Bâtiment de Biologie et de Biopathologie

Le pôle Laboratoires a bénéficié en juin 2019 d'un bâtiment de biologie hébergeant l'ensemble des structures du pôle. Cette réorganisation architecturale s'accompagne aussi de mutations organisationnelles avec le développement de 3 plateaux techniques : plateau technique automatisé pour les analyses de première ligne de haute cadence, plateau de microbiologie en full automation, plateforme de biologie moléculaire incluant les analyses concernant l'humain et l'infectieux. Afin d'assurer ce nouveau projet et la transition technologique qui l'accompagne, différents groupes de travail ont été constitués et j'ai participé aux groupes suivants.

- *RTE/PTA*

Dans ce groupe, j'ai participé aux choix technologiques des solutions automatisées et à la micro-implantation des locaux.

- Full Automation

J'ai piloté ce groupe, là aussi, dans l'optique du choix technique via la procédure d'appel d'offre.

- RH

Nous avons dans ce groupe traité de la gouvernance et de la gestion prévisionnelle des métiers et des compétences (GPMC).

- Déménagement

Ce groupe avait pour objectif de phaser le déménagement et d'assurer la coordination entre les différents services supports.

Suppléance du Laboratoire de Biologie Médicale

Depuis la nomination du nouveau chef de pôle en novembre 2017 (Dr Patricia FRANCK), j'assume la fonction de suppléante du Laboratoire de Biologie Médicale. Je traite donc avec le chef de pôle les dossiers majeurs de notre pôle : institutionnels, médico-économiques, innovations, ...

Responsabilité du Plateau technique automatisé du nouveau Bâtiment de Biologie et de Biopathologie

Dans le nouveau bâtiment, j'assume la coordination du PTA (Plateau Technique Automatisé) (52 millions de B/BHN), qui mutualise les analyses de biochimie générale, hormonologie, immuno-diagnostic infectieux, pharmaco-toxicologie, cytologie et hémostase.

Biologiste référent pôle clinique

J'assume la fonction de biologiste référent pour le pôle MaVieGSP, maladies du vieillissement, gériatrie et soins palliatifs et pour les centres de prélèvements.

PERSPECTIVES

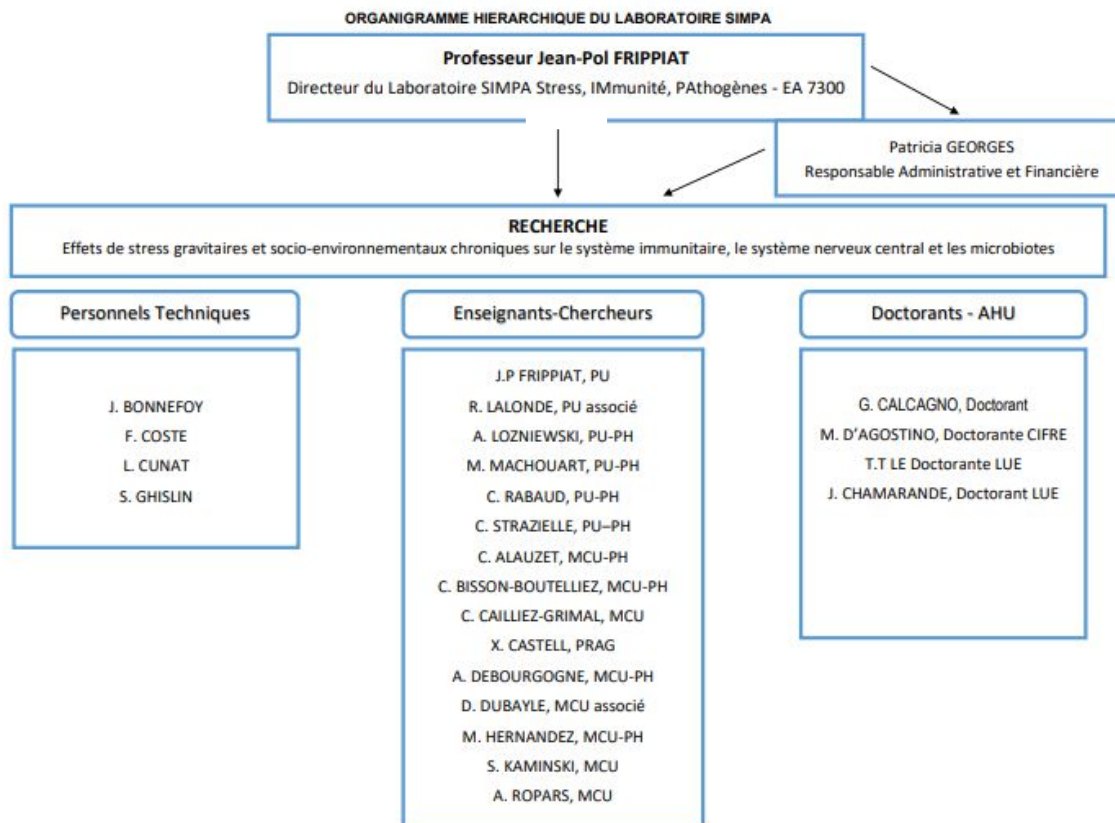
Notre laboratoire se positionne en tant que référence régionale en Parasitologie Mycologie. En effet, aucune structure équivalente n'existe en Lorraine. Il faut donc le rendre toujours plus attractif au regard des centres hospitaliers périphériques et des laboratoires privés. Ainsi la présence de biologistes spécialisés dans le domaine est déjà une plus-value, tout comme le développement de techniques de pointe. Mais il faut ajouter à cela que notre laboratoire sert de relais vis-à-vis des CNR pour la déclaration de cas rares. De plus, cette démarche s'intègre parfaitement à la politique institutionnelle.

Notre discipline participe activement à la démarche de mutualisation, notamment avec les autres disciplines de microbiologie. La plateforme d'immuno-diagnostic, puis le plateau technique automatisé et la plateforme de génomique microbienne ou de biologie moléculaire sont déjà des exemples de cette nouvelle dynamique. Cette démarche s'est étendue au sein même de la structure de Microbiologie, et notamment pour la mycologie avec l'utilisation de la chaîne automatisée, qui permet de diminuer le délai de réponse aux cliniciens, d'où une prise en charge plus rapide et un meilleur pronostic.

Enfin, la démarche qualité et l'accréditation retiennent notre attention avec notamment l'objectif de la totalité des examens accrédités d'ici fin 2020.

ACTIVITES DE RECHERCHE

Mon activité de recherche s'effectue au sein de l'EA 7300 SIMPA Stress Immunité et Pathogènes dirigée par le Pr Jean Pol FRIPPIAT depuis 2013 ; précédemment nous étions rattachés à l'EA 4369 RHEM Relation Hôte Environnement Micro-organismes. Cette équipe est composée d'immunologistes, de microbiologistes et de neurobiologistes travaillant sur les effets de stress gravitaires et chroniques légers sur le système immunitaire et les micro-organismes.



Mon activité de recherche s'articule autour d'un seul pathogène : *Fusarium sp.*, le pathogène impliqué dans plusieurs règnes du monde vivant (1) en abordant différents axes de recherche.

THEMATIQUE DU DOCTORAT D'UNIVERSITE

*Ma thèse d'Université (Ecole Doctorale BioSE) intitulée « **Typage moléculaire du complexe d'espèces *Fusarium solani* et détermination de son mécanisme de résistance au voriconazole** » a été dirigée conjointement par le Pr Alain Lozniewski et le Dr Marie Machouart.*

*Les membres du complexe d'espèces *Fusarium solani* (*Nectria hematococca*) sont des champignons filamenteux cosmopolites, naturellement présents dans le sol, l'air et l'eau (2). Bien connus comme phytopathogènes, ils peuvent s'attaquer également aux surfaces telles que les peintures des grottes de Lascaux (3) ou aux mammifères dont l'Homme. En 2006, aux Etats Unis, le CDC a détecté une épidémie de 164 cas de kératites chez des porteurs de lentilles et les études épidémiologiques et moléculaires ont montré que la solution de nettoyage / conservation des lentilles de contact était à l'origine de cette contamination (4). D'autre part, le premier cas de fusariose disséminée, à point de départ cutané, a été décrit en 1973 chez un enfant présentant une leucémie (5). Ces dernières années, de nombreux cas de fusarioses disséminées ont été répertoriés plaçant ainsi *Fusarium* sp. au second rang des infections fongiques à champignons filamenteux (6). Survenant sur des terrains très fragilisés (hémopathies malignes, greffes de moelle), cette infection est dotée d'un pronostic sombre avec une mortalité de l'ordre de 50 % (7). Malgré une sensibilité aux molécules antifongiques assez limitée, le traitement de référence est le voriconazole (8).*

*Devant l'importance de cette mycose en pathologie humaine, il nous a semblé important de caractériser de façon moléculaire ce complexe d'espèces afin de pouvoir explorer ces mécanismes de transmission (identification d'une porte d'entrée ou documentation d'infections groupées) et la diversité de populations en fonction des sources d'isolement. Une méthode de MLST a donc été développée pour le complexe d'espèces *Fusarium solani* (9). Elle s'appuie sur l'analyse des polymorphismes de séquences de 5 gènes de ménage : ACC acétyl coenzyme A carboxylase, ICL isocitrate lyase, GPD glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase, MPD mannitol 1 phosphate déshydrogénase et SOD superoxyde*

dismutase. Validée sur 51 isolats épidémiologiquement distincts, cette méthode stable et reproductible présente un pouvoir discriminant de 99,1 % (9). [A6, C2]

[A6. 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.]

*Cette méthode a été utilisée pour caractériser des isolats de FSSC (*Fusarium solani* Species Complex) de différentes origines : 31 isolats cliniques et 18 d'origine végétale. Aucune différence phylogénique n'a été démontrée en fonction de l'origine de ces souches.*

Une autre technique de typage moléculaire basée sur l'analyse des polymorphismes de séquences existe pour FSSC et fait intervenir 3 gènes traditionnellement utilisés en phylogénie : une partie de la région intergénique associée au domaine D1/D2 de la large sous unité ribosomale (ITS-nuLSU), le facteur d'élongation alpha (EF-1 α) et la seconde plus grande sous unité de l'ARN polymérase II (RPB2) (10)(11).

Pour une population donnée de 50 isolats de FSSC, ces deux techniques de typage ont été mises en œuvre afin de les comparer en termes de résolution phylogénétique mais aussi de pouvoir discriminant (12). Le schéma à 5 locus développé par notre équipe est plus discriminant (99,1 % contre 98,0 %) mais présente un moindre pouvoir de résolution phylogénique (26 nœuds bien supportés contre 31). En fonction du caractère discriminant de chacun des locus étudiés, un schéma consensus à partir de ces deux méthodes a été proposé pour le typage moléculaire de FSSC (12). [A16]

[A16. 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.]

*Les fusarioses profondes sont dotées d'une mortalité élevée. La faible sensibilité du genre *Fusarium* et plus spécifiquement du complexe d'espèces *Fusarium solani* aux molécules antifongiques peut expliquer en partie cette donnée (13). Au moment de la réalisation de ce travail, la stratégie thérapeutique recommandée lors de ces infections reposait sur l'utilisation de l'amphotéricine B associée ou non au voriconazole (14). Mais une étude multicentrique française a préconisé l'utilisation du voriconazole en monothérapie, en première intention (7). L'activité des deux molécules utilisables en pratique clinique a donc été évaluée sur un panel de 48 souches cliniques et environnementales par la technique de référence CLSI M38-A2 mais aussi par la technique E-test, fréquemment utilisée en pratique courante.*

Selon la technique CLSI M38-A2, les Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) moyennes sont de 1,2 µg/mL (0,125 à 2 µg/mL) pour l'amphotéricine B et de 4,6 µg/mL (1 à 16 µg/mL) pour le voriconazole (15). Afin de comparer les deux méthodes de détermination des CMI, le pourcentage de concordance a été évalué et est de 92 % pour le voriconazole mais seulement de 73 % pour l'amphotéricine B. Nous pouvons donc nous interroger sur la valeur prédictive des tests utilisés en pratique courante pour l'amphotéricine B [A12].

[A12. 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. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2012; 31(4):615-618.]

Ces valeurs de CMI ont été rapprochées des données de phylogénie mais aucune association entre les caractéristiques moléculaires et la sensibilité aux antifongiques n'a été mise en évidence.

Après la détermination des CMI vis-à-vis des principaux antifongiques, différents mécanismes de résistance au voriconazole ont commencé à être explorés.

D'une part, un mécanisme de résistance par efflux a été recherché en étudiant les CMI de FSSC vis-à-vis du voriconazole en présence d'agents bloqueurs tels que le vérapamil, l'ibuprofène et la carbonyl cyanide 3-chloro-phenylhydrazone à trois niveaux de

concentrations différentes (16). L'ajout de substances bloquant les pompes à efflux n'a aucun effet sur les CMI au voriconazole.

*D'autre part, une résistance par mutation de la cible a été recherchée. La protéine cible des antifongiques azolés est la 14 alpha déméthylase, enzyme responsable de la synthèse de l'ergostérol appelée CYP51 chez les champignons filamenteux et ERG11 chez les levures. Dans le complexe d'espèces *Fusarium solani*, la protéine CYP51 est présente sous 3 isoformes A, B et C (17). Les séquences protéiques des 3 CYP51 ont été déterminées dans notre population et comparées aux valeurs de CMI afin d'identifier des points de mutations, mais aucun lien n'a été établie. Cependant, il a été observé que plusieurs souches présentaient une isoforme CYP51B tronquée.*

EXPOSE SYNTHETIQUE DES RECHERCHES POST-DOCTORALES

Axe 1 : Typage moléculaire

Mes travaux de recherche dans le cadre de ma thèse d'université m'ont permis de développer un schéma de MLST dans un premier temps [A6, C2] et de le comparer dans un second temps à une méthode d'analyse phylogénique pour proposer un schéma consensus [A16]. (Voir paragraphe dédié à la thèse d'Université)

Le schéma de MLST a été utilisé par caractériser des cas groupés de fusarioses chez des requins marteaux dans un aquarium de Miami.

[A33. Desoubeaux G, Debourgogne A, Wiederhold NP, Zaffino M, Sutton D, Burns RE, Frasca S Jr, Hyatt MW, Cray C. Multi-locus sequence typing provides epidemiological insights for diseased sharks infected with fungi belonging to the *Fusarium solani* species complex. *Med Mycol.* 2018 Jul 1;56(5):591-601.]

Table 2. MLST genotypes of the seven strains belonging to the *Fusarium solani* species complex (FSSC) included in this study. *Metarhizium robertsii* isolate (strain C) was not submitted to genotyping. Individual sequence type (ST) numbers were assigned to unique allelic variants for each of the five haploid polymorphic loci (Suppl. Material 3). These numbers were then combined to yield a five-digit FSSC ST, as described previously (Debourgogne et al., 2010; Debourgogne, Gueidan, de Hoog, Lozniewski, & Machouart, 2012).

Strain No.	ACC locus	ICL locus	GDP locus	MDP locus	SOD locus	Multilocus genotype [□]
A	2	2	2	3	3	3
B	1	1	1	2	2	2
D	1	1	1	1	1	1
E	3	1	1	2	2	4
F	1	1	1	2	2	2
G	2	2	2	3	3	3
H	4	3	3	4	4	5

Abbreviations: ACC, AcetylCoenzyme A carboxylase; ICL, Isocitrate lyase; GDP, Glyceraldehyde-3P deshydrogenase; MDP, Mannitol-1P deshydrogenase; SOD, Manganese superoxide dismutase.

[□]the multilocus FSSC sequence genotype was determined from the combination of the five loci, considered together. Two multilocus genotypes were similar if the combinations of the five alleles were strictly the same.

Plusieurs complexes d'espèces sont impliqués en pathologie humaine (18), mais leur identification précise est difficile par les techniques phénotypiques macroscopiques et microscopiques (19). Des schémas d'identification moléculaire impliquant plusieurs gènes ont donc été décrits en utilisant des bases de données spécifiques (20). Cependant, en

pratique clinique, l'identification moléculaire fait habituellement recours au gène ITS en utilisant la base de données GenBank (21). Dans le cadre de son mémoire de DES de Biologie médicale, après une synthèse de l'épidémiologie locale des infections à *Fusarium* [A40], **Benoît THOMAS** a comparé pour 33 isolats de *Fusarium* les performances de 5 stratégies d'identification faisant intervenir 4 gènes : ITS (internal transcribed spacer), *EF1a* (translation elongation factor 1 alpha), *RPB1* (largest subunit of RNA polymerase) and *RPB2* (second largest subunit of RNA polymerase) et 2 bases de données : GenBank et *Fusarium* MLST (MultiLocus Sequence Typing). La conclusion de cette étude a montré qu'il était plus pertinent en pratique clinique d'utiliser le gène *EF1* pour l'identification d'une culture fongique et le gène ITS à partir d'un échantillon primaire. Dans les deux cas, la base de données spécifique *Fusarium* MLST est préférable.

[A35. Thomas B, Contet Audonneau N, Machouart M, Debourgogne A. Molecular identification of *Fusarium* species complexes: Which gene and which database to choose in clinical practice? *J Mycol Med.* 2019 Apr;29(1):56-58.]

Table 1
Comparison of the performances of the different identification schemes: gene/database.

	<i>F. oxysporum</i> species complex (n=19)	<i>F. solani</i> species complex (n=10)	<i>G. fujikuroi</i> species complex (n=3)	<i>F. dimerum</i> species complex (n=1)
<i>ITS/GenBank</i>				
Maximum similarity (%)	100	100	100	99
Median similarity (%)	100	99.6	99.67	99
Minimum similarity (%)	100	99.6	99.67	99
Number of different answers of the first order	1.21	2.80	4.33	1.00
Number of different responses of the 20 occurrences	1.21	3.30	6.33	2.00
<i>ITS/Fusarium MLST</i>				
Maximum similarity (%)	99.99	99.98	99.77	99.62
Median similarity (%)	99.57	99.73	98.68	99.62
Minimum similarity (%)	93.04	99.26	91.81	99.62
Number of different answers of the first order	1.21	1.00	1.00	1.00
Number of different responses of the 20 occurrences	3.00	1.00	2.00	1.00
<i>EF1/Fusarium MLST</i>				
Maximum similarity (%)	99.97	99.83	99.61	99.83
Median similarity (%)	99.33	98.71	93.27	99.83
Minimum similarity (%)	99.21	97.91	92.80	99.83
Number of different answers of the first order	1.00	1.00	1.00	1.00
Number of different responses of the 20 occurrences	1.05	1.00	1.67	1.00
<i>RPB1/Fusarium MLST</i>				
Maximum similarity (%)	99.56	97.63	99.35	99.73
Median similarity (%)	96.66	85.85	95.87	80.55
Minimum similarity (%)	95.04	84.41	94.79	79.93
Number of different answers of the first order	1.00	1.00	1.00	1.00
Number of different responses of the 20 occurrences	5.00	9.90	5.00	7.00
<i>RPB2/Fusarium MLST</i>				
Maximum similarity (%)	99.73	99.86	98.75	100.00
Median similarity (%)	95.54	98.24	96.20	82.43
Minimum similarity (%)	95.14	96.93	95.32	82.13
Number of different answers of the first order	1.00	1.00	1.00	1.00
Number of different responses of the 20 occurrences	6.00	1.00	4.67	2.00

For each identification condition and each species complex, the average percentage of similarity (maximum, median and minimum), the number of different responses from the first order and the total number of different responses are given.

Valorisation de cet axe :

- 5 publications

- 1 communication orale

*- 1 encadrement de mémoire de DES de Biologie médicale / Thèse d'exercice
en Pharmacie*

Axe 2 : Antifongiques

En pratique clinique, le traitement de référence d'une fusariose invasive est le voriconazole et dans certaines circonstances, l'amphotéricine B peut également être utilisée (8). Dans le cadre de mes travaux de doctorat d'université, les CMI de ces deux molécules ont été déterminées sur un panel de souches du complexe d'espèces *Fusarium solani* selon deux méthodes : dilution en milieu liquide CLSI et E-test [A12].

Les antifongiques azolés, dont le voriconazole, ciblent et bloquent la 14 alpha déméthylase, ce qui conduit à une inhibition de la synthèse de l'ergostérol. Cette enzyme est codée par le gène *CYP51* chez les champignons filamenteux, présents sous 3 isoformes chez *Fusarium* *CYP51A*, *B* et *C*. Dans le cadre de leur stage de Master 1, **Claire DUFAY** et **Thomas LEMMET** ont mis au point une RT-qPCR multiplex ciblant les gènes *CYP51A* et *GAPDH* (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase), utilisé comme gène de référence. Lors de son stage de Master 1, **Maurine d'AGOSTINO** a appliqué cette technique à la mesure de l'expression de *CYP51A* en présence de concentration sub-inhibitrice d'antifongiques azolés utilisés en pratique clinique ou en agriculture. Cette étude a pu montrer une augmentation de la surexpression de *CYP51A* en présence de concentration subinhibitrice de voriconazole, mais aussi d'autres molécules antifongiques telles que le posaconazole (utilisé en clinique) ou le tébuconazole (utilisé en agriculture).

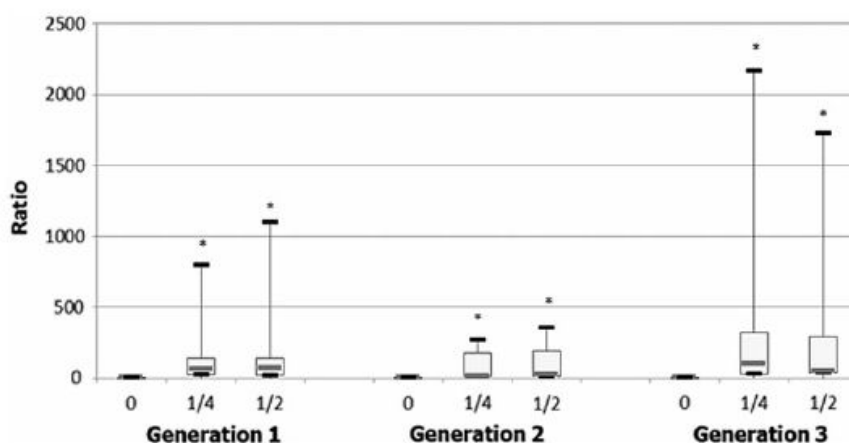


FIG. 2. *CYP51A* expression in the presence of voriconazole (* $p < 0.016$). For each generation cultivated in the presence of one-quarter or one-half the voriconazole MIC, the relative expression of *CYP51A* was determined by RT-qPCR. The signals obtained were expressed relative to corresponding controls (set to 1) grown without voriconazole. Strains used were CBS 115660, CBS 124630, CBS 124899, CBS 124895, CBS 118931, CBS 124889, CBS 224.34, CBS 102824, and CBS 117608. The comparison is statistically significant according to the Friedman test if p -value < 0.016 . MIC, minimum inhibitory concentration.

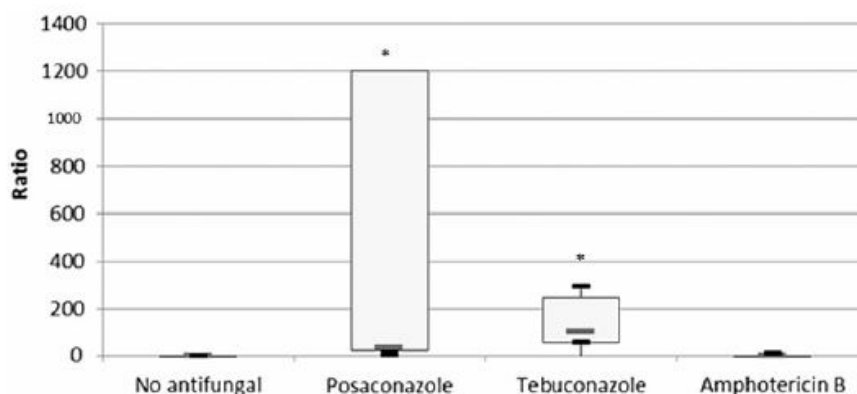


FIG. 3. *CYP51A* expression in the presence of other antifungal agents (* $p < 0.016$). Relative expression of *CYP51A* determined by RT-qPCR after culture of strains CBS 124899, CBS 118931, CBS 124896, and CBS 124629 in the presence of posaconazole, tebuconazole, or amphotericin B (1/2 MIC). The signals obtained were expressed relative to corresponding controls (set to 1) grown without antifungals. The comparison is statistically significant according to the Friedman test if p -value < 0.016 .

[A32. D'Agostino M, Lemmet T, Dufay C, Luc A, Frippiat JP, Machouart M, Debourgogne A. Overinduction of CYP51A Gene After Exposure to Azole Antifungals Provides a First Clue to Resistance Mechanism in Fusarium solani Species Complex. Microb Drug Resist. 2018 Jul/Aug;24(6):768-773.]

Ainsi, les limites des molécules conventionnelles (azolés notamment) ont été observées vis-à-vis du complexe d'espèces Fusarium solani, à savoir CMI élevées et mécanisme de résistance potentiel par surexpression de la cible, induit en présence de molécules de la même famille.

Pour ce type de champignons émergents et résistants, il est nécessaire de pouvoir bénéficier de nouvelles classes de molécules antifongiques. Ainsi, le règne végétal représente une immense ressource de substances naturelles présentant des propriétés antifongiques telles que les huiles essentielles et leurs composés actifs. Afin de préparer sa thèse d'Université, Maurine d'AGOSTINO a synthétisé l'ensemble des données sur le sujet.

[A38. D'agostino M, Tesse N, Frippiat JP, Machouart M, Debourgogne A. Essential Oils and Their Natural Active Compounds Presenting Antifungal Properties. Molecules. 2019 Oct 15;24(20).]

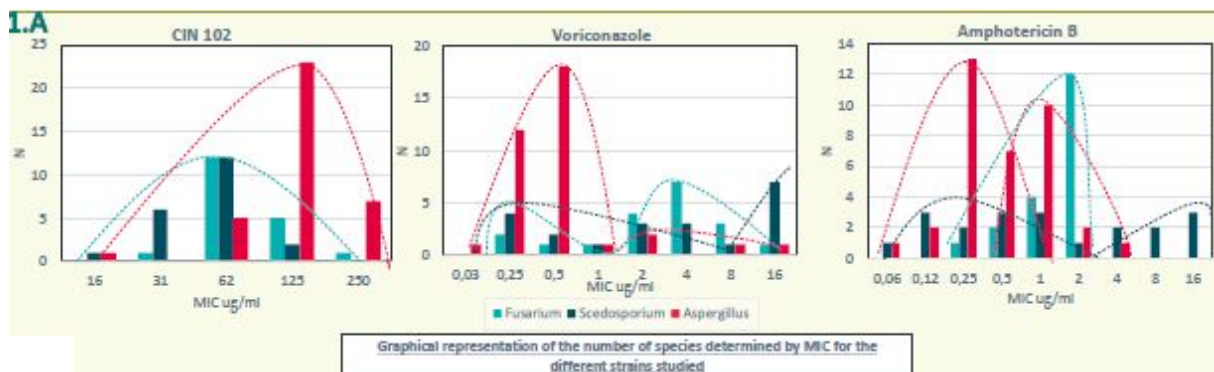
La société SEPTEOS[®], spécialisée dans le secteur du développement en biotechnologie, a mis au point un mélange de 7 composés différents, d'origine végétale, appelé CIN-102 et

comprenant 3 dérivés du cinnamaldéhyde. Ce mélange a été élaboré à partir de deux huiles essentielles de cannelle disponibles dans la Pharmacopée Européenne, pour lesquelles les composés génotoxiques ont été soustraits. CIN-102 fait actuellement l'objet d'études sur ces potentielles activités anti-infectieuses et la société est en discussions avec l'EMA (Agence européenne des médicaments) pour une qualification orpheline dans l'aspergillose invasive. Ainsi, dans le cadre d'une bourse CIFRE, un partenariat industriel a été réalisé avec la société SEPTEOS dans le cadre de la thèse d'Université de **Maurine d'AGOSTINO** intitulée « **Caractérisation de l'effet antifongique du composé d'origine végétale CIN-102 sur les champignons filamenteux septés et plus particulièrement le complexe d'espèces *Fusarium solani*** ».

L'objectif principal de ce travail est de **caractériser les propriétés antifongiques du composé CIN-102**. En particulier, il convient donc d'établir le spectre d'activité vis-à-vis des principaux genres ou espèces de champignons filamenteux impliqués en pathologie humaine, mais aussi vis-à-vis de situations critiques en pratique clinique (résistances aux antifongiques, synthèse de biofilm, résistance induite). Le mode d'action de CIN-102 est également exploré (action fongicide ou fongistatique ?, effet dose ou effet temps ?, présence d'un effet post-antifongique ?) et enfin une approche du mécanisme d'action sera explorée.

L'objectif secondaire est **méthodologique** et consiste à proposer et décrire une démarche expérimentale associée à différents modèles déjà validés pour la caractérisation des nouvelles molécules ou composés antifongiques, vis-à-vis notamment des champignons filamenteux.

Les premiers résultats ont été présentés sous forme de poster [P12] lors du TIMM (Trends in Medical Mycology) 2019.



Pour les 3 genres de champignons filamenteux, les CMI sont distribuées de manière unimodale entre 62 et 250 µg/mL, que les souches soient résistantes ou non aux molécules actuelles. La substance CIN 102 présente un effet inoculum, un effet post-antifongique et une inhibition de la germination des spores. Une publication dédiée à ces données est en cours de soumission.

Valorisation de cet axe :

- 3 publications (+ 1 en cours de soumission)*
- 1 communication orale*
- 1 communication affichée*
- 3 encadrements de Master 1 (dont 1 SIR)*
- 1 encadrement de Thèse d'Université*

Axe 3 : Physiologie & Stress

*La création de l'EA Stress Immunité Pathogènes a été favorisée par une dynamique initiée entre microbiologistes et immunologistes appartenant respectivement à cette période à d'autres équipes de recherche. Les immunologistes bénéficiant d'une grande expérience dans les modèles de stress gravitaire (microgravité et/ou hypergravité), nous nous sommes donc intéressés, en parallèle de notre thématique principale de recherche, à l'étude de l'adaptation au stress du complexe d'espèces *Fusarium solani*.*

Dans l'Espace, la gravité et les radiations ionisantes sont les deux paramètres physiques qui varient considérablement par rapport aux conditions de vie sur Terre tant pour l'Homme que pour les micro-organismes, imposant une adaptation rapide des cellules vivantes pour la survie de leur espèce (22).

En situation de microgravité, la problématique des maladies infectieuses semble majorée puisque la relation hôte/pathogène est fortement déséquilibrée avec une altération du système immunitaire associée à une augmentation de la virulence et de la résistance des micro-organismes (23).

*Dans l'Espace comme sur Terre, l'Homme est soumis à la présence de nombreux micro-organismes, bactéries ou champignons, présents de manière endogène (flore de l'individu) et exogène (environnement) (22). La diversité des micro-organismes a été décrite dans différentes conditions de vie spatiale et a montré la présence du champignon filamenteux *Fusarium* (24)(25). Ce micro-organisme est connu pour son implication en pathologie humaine mais aussi pour ses conséquences en termes de dégradation matérielle.*

*Il semble donc intéressant de mettre en évidence les variabilités génétiques et physiologiques des champignons dans ces conditions de microgravité. De plus, les études retrouvées jusqu'alors dans la littérature concernent principalement les bactéries et quelques levures commensales telles que *Candida albicans* ou *Saccharomyces cerevisiae*. Notre projet permettrait de s'intéresser pour la première fois à un champignon filamenteux, de plus dans des conditions de contaminations exogènes. Ce modèle de stress microgravitaire nous permettra de dégager des hypothèses et des réflexions sur d'autres conditions de stress intenses pour l'Homme, par exemple, lors de pathologies engendrant une diminution de la réponse immunitaire.*

D'un point de vue méthodologique, un panel de souches de *Fusarium solani* est soumis aux conditions de microgravité grâce à l'utilisation de modèles de microgravité simulée mis à disposition telle que la Random Positioning Machine. Les mêmes souches cultivées dans des conditions standards servent de témoin.

L'effet de la microgravité a été observé sur les caractères macroscopiques des cultures. Pour l'ensemble des expérimentations, aucun élément consensuel de variabilité n'a été observé. Cependant, pour certaines souches, dans des conditions de microgravité, les colonies sont plus denses, plus épaisses, de plus grand diamètre et d'apparence laineuse. Parfois, un halo transparent autour de la culture est visible.

En conditions de microgravité, la synthèse de biofilm est diminuée de 30 %. Dans le cadre de son stage de Master 2, après avoir développé un modèle de génération de biofilm en condition de microgravité, **Maurine d'AGOSTINO** a mis en évidence cette diminution par deux méthodologies complémentaires : la mesure de l'activité métabolique du biofilm (activité du XTT) et l'épaisseur du biofilm (microscopie confocale).

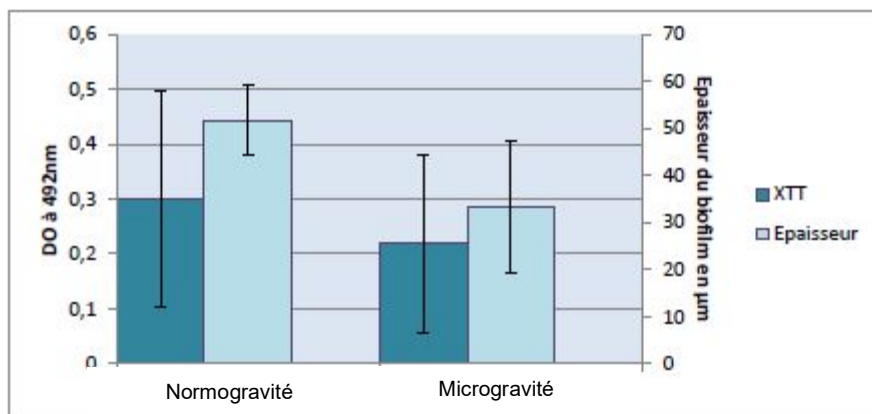


Figure 2 : Effet de la microgravité sur le biofilm

Après l'étude du biofilm, nous nous sommes intéressés à la paroi du champignon, élément en lien direct avec les stress environnementaux. Dans le cadre de son stage de Master 1 (SIR), **Guillaume POIROT** a mis au point une RT-qPCR multiplex ciblant les gènes *GfaA* (glutamine fructose-6-phosphate amidotransférase) et *GAPDH* (glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase), utilisé comme gène de référence. Cette technique, qui permet de mesurer l'expression de *GfaA* et ainsi de monitorer la synthèse de chitine d'un champignon, a été validée sur un modèle de stress de la paroi avec le calcofluor white. Ensuite **Emma LEPAGE**, Master 1 (SIR,) a montré en condition de microgravité et en présence d'un stress

chimique, une augmentation de la synthèse de chitine par technique colorimétrique alors que l'expression de GfaA semble stable. Ces résultats préliminaires soulèvent de nouvelles hypothèses à explorer dans les mois à venir.

Valorisation de cet axe :

- 1 publication en cours de rédaction*
- 2 encadrements de Master 1 (SIR)*
- 1 encadrement de Master 2*

CONTRATS & COLLABORATIONS

*Un contrat de collaboration a été établi entre l'Université de Lorraine et la société **SEPTEOS** pour un montant est de **112 392 euros**. Le projet est porté conjointement par Marie MACHOUART et Anne DEBOURGOGNE.*

L'ensemble des travaux présentés ont fait l'objet de collaborations nationales :

- *ANSES Rage & Faune Sauvage Nancy;*
- *AP-HP Saint-Antoine ;*
- *Institut Pasteur de Paris ;*
- *CH de Guyane ;*

mais aussi internationales :

- *CBS - Pays-Bas ;*
- *Muséum d'Histoires Naturelles de Londres - Angleterre ;*
- *National Center for Agricultural Utilization Research – USA.*

Ces collaborations sont toujours actives.

PROJET DE RECHERCHE

Les axes 2 « Antifongiques » et 3 « Physiologie & Stress » seront poursuivis au cours des prochaines années.

*Dans l'axe 2 sur les antifongiques, la collaboration avec la société SEPTEOS est poursuivie. Via une approche protéomique par séquençage haut débit Illumina des librairies mRNAseq, la cible cellulaire de CIN-102 sera recherchée pour *Aspergillus fumigatus* et *Fusarium solani*, permettant ainsi un premier screening pour étudier le mécanisme d'action de cette molécule. Une confirmation par mesure de l'expression des gènes présentant les plus grandes variabilités en présence de cette substance antifongique sera réalisée. En fonction du mécanisme identifié, une approche phénotypique et fonctionnelle sera mise en œuvre.*

Les problématiques « Résistance aux antifongiques » et « Stress » convergent autour du projet de recherche à développer dans les années à venir, qui constituera sur sa première partie, le sujet de thèse d'Université du Dr Pierre VERMEULEN, AHU au laboratoire depuis mai 2020. Plusieurs questions scientifiques seront donc abordées au cours de cette période.

Rôle des gènes CYP51 et mécanisme de résistance mis en jeu ?

*Le genre *Fusarium* présente de manière originale 3 paralogues du gène CYP51A codant pour l'enzyme 14alpha déméthylase, cible des antifongiques azolés. Chez l'espèce phytopathogène *Fusarium graminearum*, une approche fonctionnelle de chacun de ces paralogues a été explorée. Ainsi CYP51B, le plus conservé, joue un rôle essentiel dans la formation des ascospores via la 14 alpha déméthylation des stérols. CYP51A, inductible par les azolés et les stress environnementaux, code également pour l'enzyme cible avec possibilité de compensation de CYP51B et est responsable de la variation de sensibilité aux azolés. CYP51C, spécifique du genre *Fusarium*, ne présente pas d'activité 14 alpha-déméthylase mais est impliqué dans l'invasion des tissus végétaux et la virulence (17,26,27).*

Un suivi de l'expression de chacun de ces paralogues sera réalisé en développant une RTqPCR multiplex CYP51A-CYP51B-CYP51C et GADP (comme gène de référence) afin de mettre en évidence les complémentarités entre les 3 CYP au niveau basal et en conditions de stress (exposition à différentes molécules d'antifongiques azolés, stress physique, ...)

Pour le champignon, la culture en présence d'antifongiques constitue un facteur de stress majeur qui sans adaptation de sa part conduit à la mort du champignon. De ce fait, le micro-organisme met en œuvre différents mécanismes d'adaptation qui aboutissent à une résistance ou à une diminution de la sensibilité à l'antifongique. Cette situation de stress est présente en pratique clinique avec les traitements utilisés en préventif ou en curatif, mais aussi dans l'environnement avec notamment les traitements antifongiques utilisés en agriculture.

Dans un précédent travail, nous avons démontré qu'en présence de concentrations sub-inhibitrices d'antifongiques azolés (itraconazole, voriconazole, tébuconazole), l'expression du gène CYP51A augmente. Il conviendra d'explorer si cette surexpression a également des conséquences phénotypiques, à savoir une augmentation des CMI pour la molécule d'étude sélectionnée et utilisée pour l'induction mais aussi pour les autres molécules de la même classe pharmacologique.

Cette possible induction de résistance sera également explorée en termes de réversibilité. Après induction, en l'absence d'antifongiques au cours des générations suivantes, un retour de l'expression génétique et des CMI à un niveau basal est-il observé ou la résistance induite est-elle conservée même en l'absence de stimulation antifongique ?

Ce mécanisme d'induction sera également décrit pour les nouveaux antifongiques azolés récemment mis sur le marché tel que l'isavuconazole mais aussi les molécules en développement.

*Des travaux récents montrent, chez *Fusarium solani*, qu'une délétion de 23 pb dans la région promotrice du gène CYP51A serait associée à une résistance au voriconazole (27). Il conviendra donc de rechercher cette délétion chez nos souches d'intérêts par séquençage Sanger et de déterminer son implication dans la diminution de sensibilité au voriconazole mais aussi aux autres antifongiques azolés. Le caractère inductible de cette délétion sera également exploré. De manière plus générale, il sera intéressant de voir l'effet d'une croissance en présence de substances antifongiques sur la séquence protéique des différentes*

isoformes et de réaliser une analyse conformationnelle 3D entre la 14 α déméthylase et les principales molécules antifongiques.

Résistance par efflux actif ?

Lors de travaux préliminaires, l'ajout d'agents bloqueurs tels que le vérapamil, l'ibuprofène et la carbonyl cyanide 3-chloro-phenylhydrazone (16) n'avait présenté aucun effet sur les CMI au voriconazole. Cependant, des données issues de mutagenèse chez *Fusarium graminearum* montrent le rôle de 3 transporteurs ABC, FgABC3, FgABC1 et FgABCC9 dans la résistance aux antifongiques utilisés en agriculture (tébuconazole ou benalaxyl) (28–30). Cette activité d'efflux actif sera explorée par cytométrie en flux avec la rhodamine 6G (31) chez *Fusarium solani* et l'expression des gènes potentiels d'intérêts sera mesurée en présence de différentes molécules antifongiques.

Etude clinique multicentrique sur les fusarioses invasives : à la recherche de marqueurs d'infection et de résistance FUSIMIR

En collaboration avec la Délégation à la Recherche Clinique et à l'Innovation du CHRU de Nancy, une étude clinique multicentrique sur les fusarioses invasives et les kératites fusariennes va être menée. Il s'agit d'une étude non interventionnelle, prospective cas (fusariose) – 2 témoins (autre IFI / pas d'IFI), nichée dans une étude de cohorte.

L'objectif principal est de décrire les proportions des différentes espèces fongiques chez les patients immunodéprimés présentant une infection fongique invasive ou une kératite fongique.

Différents objectifs secondaires seront associés :

- Comparaison du dosage des galactomannanes et du béta-(1,3)-D-glucanes et du taux de détection d'ADN circulant dans les différents groupes
- Comparaison de la distribution des différentes CMI selon le statut d'exposition préalable à des antifongiques
- Comparaison de la distribution de différentes CMI selon le statut vital à 3 mois et la réponse ou non au traitement
- Comparaison de la présence de marqueurs génétiques (mutation, délétion) selon les groupes de valeurs de CMI.

*Effet du stress gravitaire sur les aspects phénotypiques de *Fusarium solani* ?*

L'axe 3 sur « Physiologie » et « Stress microgravitaire » sera plus amplement développé au cours des prochaines années. Dans un premier temps, les caractères cultureux et structuraux seront comparés entre les souches soumises à la microgravité ou non. Nous nous intéresserons donc à la viabilité, à la vitesse de croissance du champignon, à la modification de caractères structuraux (filaments, chlamydospores) et à la sporulation.

Après ces aspects descriptifs, il conviendra de déterminer par quel(s) constituant(s) cellulaire(s) l'adaptation des champignons au stress microgravitaire est mise en œuvre.

*Effet du stress gravitaire sur la sensibilité aux antifongiques de *Fusarium solani* ?*

Dans un second temps, la sensibilité aux différents antifongiques utilisés en thérapeutique sera évaluée en condition de microgravité par la détermination des CMI. L'adaptation aux situations de microgravité sera explorée de manière moléculaire également grâce aux outils développés lors de l'axe 2. En effet, pour pouvoir suivre cette modulation de la sensibilité aux antifongiques face à des situations de stress, il est impératif de caractériser le mécanisme de résistance et la cible moléculaire portant cette résistance, ainsi que les modalités d'adaptation à des stress simples tels que la pression antifongique.

*Apport de la transcriptomique sur les phénomènes d'adaptation de *Fusarium solani**

L'approche transcriptomique va permettre sous une technologie commune d'assurer la convergence de nos différents axes. Elle va permettre de réaliser l'analyse différentielle de différentes conditions de stress et aussi d'isoler de potentiels mécanismes d'action et d'adaptation.

*En effet, nous allons étudier via une approche protéomique par séquençage haut débit Illumina des librairies mRNAseq, 3 conditions de culture pour *Fusarium solani* (associée à une condition témoin en normogravité sans antifongiques) :*

- En présence de CIN-102 (à la concentration CMI et pendant une courte durée), pour donner des hypothèses de mécanisme d'action à ce nouveau composé*

- *En présence de Voriconazole (à concentration sub-inhibitrice pendant une génération), pour isoler des mécanismes d'adaptation et donc de résistance à un composé azolé*
- *En condition de microgravité pour identifier de potentielles voies d'adaptation*

Cette approche permettra d'isoler des gènes ou groupes de gènes impliqués dans les trois problématiques, mais l'avantage de les réaliser en simultané sera de permettre une analyse différentielle entre la culture en présence d'antifongique et un stress physique.

Les hypothèses formulées seront vérifiées par des approches spécifiques telles que la mesure de l'expression de gènes cibles, mais aussi confirmées par des expérimentations plus larges :

- *Mécanisme de résistance observé pour d'autres molécules appartenant à la classe des azolés, mécanisme réversible, inductible ?*
- *Mécanisme d'adaptation au stress gravitaire observé lors d'autres stress physiques (température, pH, osmolarité, ...) ?*

Une fois les mécanismes d'adaptation identifiés, il conviendra de rapprocher ces données d'éléments cliniques afin d'observer si ces mêmes mécanismes in vitro sont également observés in vivo en situation de stress

Apport de la mutagénèse sur les phénomènes d'adaptation de Fusarium solani

Enfin, une approche fonctionnelle et fondamentale sera mise en œuvre afin de consolider les observations et les hypothèses formulées grâce aux résultats des différentes étapes présentées ci-dessus. La fonction exacte des gènes identifiés sera décrite en procédant à l'inactivation séquentielle de ces gènes et en observant les effets sur la résistance du champignon ou l'adaptation au stress gravitaire mais aussi sur la viabilité de la cellule.

La mise au point de la méthodologie d'inactivation génique sera une technique à acquérir dans un autre laboratoire qui en a la maîtrise, lors de mon projet de mobilité. Aujourd'hui, la technique la plus innovante pour la réalisation de « genome editing » est la technologie CRISPR/Cas 9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat), qui est venue détrôner toutes les autres approches, et ce pour quatre raisons : précision, rapidité, fiabilité et faible coût (32). Cette technologie a déjà été menée chez le genre Fusarium et plus

particulièrement les espèces Fusarium proliferatum (33), Fusarium graminearum (34), Fusarium fujikuroi (35), Fusarium oxysporum (36,37) et Fusarium solani (38).

Actuellement, les démarches sont en cours pour rechercher un laboratoire d'accueil et préciser les modalités d'organisation.

ACTIVITES PEDAGOGIQUES

ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

Premier cycle et Deuxième cycle des Etudes de Médecine

- *FGSM2, cours introductif à la parasitologie mycologie,*
- *FGSM3, moitié des enseignements*

DES de Biologie médicale

- *Formation des internes à la garde multidisciplinaire pour la recherche de paludisme*
- *Séminaires de formations sur les thématiques de notre discipline (6 heures par an)*
- *Formations et des présentations de cas cliniques ou de diagnostics différentiels*

Diplômes d'Université

- *Diplôme Universitaire Prévention et Infections Nosocomiales (3 heures)*

Masters (Faculté des Sciences)

- *Master 2 Microbiologie,*

Ecole de Maïeutique

- *Première année des enseignements de maïeutique (9 heures par an).*

Enseignements Post Universitaires

- *Formation continue aux biologistes « Biologie Prospective »*

ACTIVITES D'ENCADREMENTS

Depuis mon arrivée en tant que AHU au sein de la faculté de médecine de l'Université de Lorraine, j'ai dirigé ou co-dirigé les travaux de plusieurs étudiants, ce qui a donné lieu à des publications scientifiques ou des communications.

Stage d'initiation à la recherche

- 2015 : Faculté de médecine (stage de 2 mois réparti sur l'année universitaire)

Mr Thomas LEMMET

*Etude de la surexpression de CYP51A chez le complexe d'espèces *Fusarium solani* en présence de voriconazole* **[A32]**

- 2018 : Faculté de médecine (stage de 2 mois - période estivale)

Mr Guillaume POIROT

*Effet de la microgravité sur la paroi du complexe d'espèces *Fusarium solani* : mise au point de la mesure de l'expression de GfaA* **[article en cours de rédaction]**

- 2020 : Faculté de médecine (stage de 2 mois - période estivale)

Melle Emma LEPAGE

*Effet de la microgravité sur la paroi du complexe d'espèces *Fusarium solani* : suivi enzymatique et génomique de la synthèse de la chitine*

Master 1

- 2014 : *Master 1 Biosciences et Ingénierie de la Santé* (stage de 2 mois)
Melle Claire DUFAY
Développement d'une qRT-PCR CYP51 adaptée au complexe d'espèces
Fusarium solani [A32]

- 2015 : *Master 1 Biotechnologies Microbiologie Aliments Nutrition Environnement*
(stage de 2 mois)
Melle Rifk RIAHI
Délétion du gène CYP51A de Fusarium solani par ATMT : validation des
étapes préliminaires

- 2016 : *Master 1 Biosciences et Ingénierie de la Santé* (stage de 2 mois)
Melle Maurine D'AGOSTINO
Détermination du mécanisme de résistance de Fusarium solani au
voriconazole : séquençage et mesure de l'expression du gène CYP51 A [A32, C9]

Master 2

- 2017 : *Master 2 Biosciences et Ingénierie de la Santé* (stage de 6 mois)

Melle Maurine D'AGOSTINO

*Effet de la microgravité sur la physiologie de Fusarium solani : étude du
biofilm* *[article en cours de rédaction]*

Thèse d'Université

En janvier 2019, j'ai obtenu l'Autorisation de Codiriger une Thèse et je participerai cette année aux formations dédiées à l'encadrement d'un doctorant proposées par l'Université de Lorraine.

- 2018-2021 : Thèse d'Université

*(Ecole Doctorale BioSE – financement par une bourse CIFRE –
collaboration avec le partenaire industriel SEPTEOS)*

Melle Maurine D'AGOSTINO

*Caractérisation de l'effet antifongique du composé d'origine végétale CIN-102
sur les champignons filamenteux septés et plus particulièrement le complexe
d'espèces *Fusarium solani**

[A38, P12, article en cours de soumission]

- 2020 – 2023 : Thèse d'Université (Ecole Doctorale BioSE)

Mr Pierre VERMEULEN

*Mécanisme de résistance du complexe d'espèces *Fusarium solani* aux
antifongiques azolés*

Direction de Thèses de Docteur d'Etat en Pharmacie ou Médecine et mémoires de DES de Biologie médicale

- 2011 : Mme Stéphanie FAVREAU AVENEL

*Pneumocystose à *Pneumocystis jirovecii* : d'une analyse épidémiologique locale à l'introduction d'un nouvel outil moléculaire de diagnostic*

Soutenance le 14 novembre 2011

[A19, P4]

- 2013 : Melle Pascale PEREZ

*Typage de *Staphylococcus aureus* par MLVA : étude de faisabilité de la détection par HRM*

Soutenance le 22 octobre 2013

- 2015 : Mr Julien DECKER

Aspergillose broncho-pulmonaire allergique : d'une analyse épidémiologique chez des patients mucoviscidiques à l'introduction d'une nouvelle technique de confirmation sérologique

Soutenance le 12 février 2015

[P6]

- 2015 : Melle Cynthia PIANETTI

Place de l'immuno-analyse dans le diagnostic des candidoses invasives

Soutenance le 09 avril 2015

[C7]

- 2017 : Mr Benoit THOMAS

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

Soutenance le 12 septembre 2017

[A35, A40, C8]

- 2019 : Melle Charlotte STEPHAN

Création d'un site internet de fiche synthétique en Bactériologie et Parasitologie Mycologie

Soutenance le 10 octobre 2019

Pour les formations universitaires, 61 % des encadrements ont été valorisés à ce jour par des publications scientifiques ou des communications en congrès. Plusieurs rédactions d'articles sont en cours.

Autres formations

Licence professionnelle

- 2012 : *Techniques diagnostiques spécialisées en biologie médicale (stage de 2 mois)*

Melle Stéphanie PENEY

Validation des méthodes de détection des anticorps anti-Toxoplasma gondii et de dépistage du VIH

BTS

- 2010 : *BTS Biotechnologie 2^{ème} année (stage de 2 mois)*

Mr Matthieu HENRION

Développement d'une PCR quantitative en temps réel sur Light Cycler pour le diagnostic des infections à Pneumocystis jirovecii

Participation à jurys de thèses et mémoires

J'ai également été sollicitée pour faire partie du jury de plusieurs thèses d'exercice.

- *2010 : Thèse d'exercice de Docteur en Pharmacie*

Mme Anne-Lorraine PIERQUIN

Mycoses opportunistes et immunodépression

- *2011 : Thèse d'exercice de Docteur en Pharmacie*

Mr Arnaud WIECZOREK

La bilharziose : épidémiologie, pathologie et stratégie de dépistage. Les schistosomoses d'importation en France métropolitaine illustrées par des cas cliniques du CHU de Nancy.

- *2012 : Thèse d'exercice de Docteur en Pharmacie*

Mme Lamy EL BOUHALI

Toxoplasmose et Grossesse

- *2012 : Thèse d'exercice de Docteur en Pharmacie*

Mme Hélène TARTARE

Les Dermatophytoses équine et leur transmission à l'Homme

- 2013 : *Thèse d'exercice de Docteur en Pharmacie*

Mr Mathieu BLOCH

Les candidoses chez l'immunodéprimé d'ordre secondaire

- 2015 : *Thèse d'exercice de Docteur en Pharmacie*

Melle Hélène THOMAS

Actualités sur le paludisme – Ce que doit savoir le pharmacien d'officine

- 2017 : *Thèse d'exercice de Docteur en Pharmacie*

Melle Bérénice DURAND

Traitements des mycoses vulvo-vaginales aiguës et récidivantes

- 2018 : *Thèse d'exercice de Docteur en Médecine*

Melle Delphine CORDARY

*Vers la mise en place d'un observatoire des RAI :
Étude rétrospective sur la prise en charge des femmes enceintes ayant une RAI
positive et évaluation des pratiques professionnelles sur l'allo-immunisation
fœto-maternelle érythrocytaire*

- 2020 : *Thèse d'exercice de Docteur en Médecine*

Mme Morgane BOURNE-WATRIN

Formes pulmonaires d'histoplasmosse chez les patients VIH en Guyane

PERSPECTIVES

Je souhaite poursuivre mon investissement dans l'enseignement de Parasitologie Mycologie. Il est important de préparer les étudiants en médecine dès le début du deuxième cycle à l'ECN en associant cours magistraux et analyses de dossiers cliniques et biologiques et ce en s'adaptant aux réformes des études médicales qui impacteront fortement les enseignements en terme de méthodes d'enseignement et de contenu.

En effet, nos enseignements et les examens en rapport à ces derniers sont en train de subir une mutation au niveau de la forme avec le recours aux nouvelles technologies (banque de données électronique, composition sur tablettes). Ainsi, j'ai suivi les formations SIDES (Système Informatique Distribué d'Evaluation en Santé) et alimente régulièrement la base de données de questions isolées ou de dossiers progressifs.

A l'interface entre les missions pédagogiques et de recherche, mes activités d'encadrement seront poursuivies (mémoire DES Biologie médicale, Master 1 et 2) et élargies avec l'accueil d'étudiants en thèse d'Université ou en post-doctorat.

En tant que membre actif de la collégiale ANOFEL, je souhaite poursuivre mon investissement dans ce domaine et participer à la rédaction d'autres ouvrages ou éditions de notre discipline en tant qu'auteur mais aussi de membre de l'équipe éditoriale.

PRODUCTION SCIENTIFIQUE**PUBLICATIONS DANS DES REVUES A COMITES DE LECTURE**

- A1. Debourgogne A, Latger-Cannard V, Montagne K, Plénat F, Lecompte T.**
A marginal zone-B cell lymphoma revealed by platelet satellitism and lympho-agglutination phenomenon around atypical lymphocytes.
Annales de Biologie Clinique 2007; 65(3):287-290.
- A2. Latger-Cannard V, Debourgogne A, Montagne K, Plénat F, Lecompte T.**
Platelet satellitism and lympho-agglutination as presenting finding in marginal zone B-cell lymphoma.
European Journal of Haematology 2009; 83(1):81-82.
- A3. Dot JM, Debourgogne A, Champigneulle J, Salles Y, Brizion M, Puyhardy JM, Collomb J, Plénat F, Machouart M.**
*Molecular diagnosis of disseminated adiaspiromycosis due to *Emmonsia crescens*.*
Journal of Clinical Microbiology 2009; 47(4):1269-1273.
- A4. Salmon A, Debourgogne A, Vasbien M, Clément L, Collomb J, Plénat F, Bordigoni P, Machouart M.**
*Disseminated *Scopulariopsis brevicaulis* infection in an allogeneic stem cell recipient: case report and review of the literature.*
Clinical Microbiology and Infection 2010; 16(5):508-512.
- A5. Gallet P, Debourgogne A, Rivier A, Marcon N, Georgel T, Ladrière M, Vignaud JM, Jankowski R, Machouart M.**
Successful management of rhinosinusual zygomycosis in a renal transplant recipient.

Mycoses 2011; 55(4):e593-598.

- A6.** *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.

- A7.** *Oddoux O, Debourgogne A, Kantele A, Kocken CH, Jokiranta TS, Vedy S, Puyhardy JM, Machouart M.*

Identification of the five human Plasmodium species including P. knowlesi by real-time polymerase chain reaction.

European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2011; 30(4):597-601.

- A8.** *Machouart M, Garcia-Hermoso D, Rivier A, Hassouni N, Catherinot E, Salmon A, Debourgogne A, Coignard H, Lecuit M, Bougnoux ME, Blanche S, Lortholary O.*

Emergence of disseminated infections due to Geosmithia argillacea in patients with chronic granulomatous disease receiving long-term azole antifungal prophylaxis.

Journal of Clinical Microbiology 2011; 49(4):1681-1683.

- A9.** *Debourgogne A, Iriart X, Blanchet D, Veron V, Boukhari R, Nacher M, Carme B, Aznar C.*

Characteristics and specificities of Cryptococcus infections in French Guiana, 1998-2008.

Medical Mycology 2011; 49(8):864-871.

- A10.** *Rivier A, Perny J, Debourgogne A, Thivillier C, Lévy B, Gérard A, Machouart M.*

Fatal disseminated infection due to Scedosporium prolificans in a patient with acute myeloid leukemia and posaconazole prophylaxis.

Leukemia Lymphoma 2011; 52(8):1607-1610.

- A11.** Lorentz C, Rivier A, **Debourgogne A**, Sokolowska-Gillois J, Vignaud JM, Jankowski R, Machouart M.

Ethmoido-maxillary sinusitis caused by the basidiomycetous fungus Schizophyllum commune.

Mycoses 2012; 55(2):e8-12.

- A12.** **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.

European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 2012; 31(4):615-618.

- A13.** Letranchant L, **Debourgogne A**, Doco-Lecompte T, Contet-Audonneau N, May T, Machouart M.

Fatal Histoplasma capsulatum mitral endocarditis in a french patient treated for rheumatoid arthritis.

Mycopathologica 2012; 173(2-3):183-186.

- A14.** Lanternier F, Dannaoui E, Morizot G, Elie C, Garcia-Hermoso D, Huerre M, Bitar D, Dromer F, Lortholary O; French Mycosis Study Group.

A global analysis of mucormycosis in France: the RetroZygo Study (2005-2007).

Clinical Infectious Diseases 2012; 54 Suppl 1:S35-43.

- A15.** **Debourgogne A**, Hagen F, Elenga N, Long L, Blanchet D, Veron V, Lortholary O, Carme B, Aznar C.

Successful treatment of Cryptococcus gattii neurocryptococcosis in a 5-year-old immunocompetent child from the French Guiana Amazon region.

Revista Iberoamericana de Micologia 2012; 29(4):210-213.

A16. 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.

A17. Perez P, Debourgogne A, Valloton T, Abdelbasset N, Barraud H, Machouart M.

High risk of Strongyloides hyperinfection in a patient with sarcoidosis.

Annales de Biologie Clinique 2013; 71(2): 211-214.

A18. Debourgogne A, Goehringer F, Umhang G, Gauchotte G, Hénard S, Boué F, May T, Machouart M.

Primary cerebral alveolar echinococcosis : mycology to the rescue.

Journal of Clinical Microbiology 2014; 52(2): 692-694.

A19. Debourgogne A, Favreau S, Ladrière M, Bourry S, Machouart M.

Characteristics of Pneumocystis pneumonia in Nancy from January 2007 to April 2011 and focus on an outbreak in nephrology.

Journal de Mycologie Médicale 2014 ; 24(1): 19-24.

A20. Roux A, Canet E, Valade S, Gangneux-Robert F, Hamane S, Lafabrie A, Maubon D, Debourgogne A, Le Gal S, Dalle F, Leterrier M, Toubas D, Pomares C, Bellanger AP, Bonhomme J, Berry A, Durand-Joly I, Magne D, Pons D, Hennequin C, Maury E, Roux P, Azoulay É.

Pneumocystis jirovecii pneumonia in patients with or without AIDS, France.

Emerg Infect Dis. 2014; 20(9): 1490-1497.

- A21.** *Lelievre L, Garcia-Hermoso D, Abdoul H, Hivelin M, Chouaki T, Toubas D, Mamez AC, Lantieri L, Lortholary O, Lanternier F; French Mycosis Study Group.*
Posttraumatic mucormycosis: a nationwide study in France and review of the literature.
Medicine (Baltimore) 2014; 93(24): 395-404.
- A22.** *Dorin J, **Debourgogne A**, Zaïdi M, Bazard MC, Machouart M.*
*First unusual case of keratitis in Europe due to the rare fungus *Metarhizium anisopliae*.*
Int J Med Microbiol. 2015; 305(3): 408-412.
- A23.** *Dorin J, Filippetti L, **Debourgogne A**, Voilliot D, Huttin O, Machouart M.*
Cardiac Manifestations of Toxocariasis: A Case Report of Löffler Endocarditis and Literature Review.
J Bacteriol Parasitol 2015; 6:226.
- A24.** ***Debourgogne A**, Blanchet D, Fior A, Umhang G, Simon S, Aznar C.*
*Neotropical echinococcosis caused by *Echinococcus vogeli* in a 6-year-old child: the second case report in humans in French Guiana*
Paediatr Int Child Health 2017; 37(1):63-65.
- A25.** *Petinataud D, Berger S, Ferdynus C, **Debourgogne A**, Contet-Audonneau N, Machouart M.*
Optimising the diagnostic strategy for onychomycosis from sample collection to FUNGAL identification evaluation of a diagnostic kit for real-time PCR.
Mycoses. 2016; 59(5):304-11.
- A26.** ***Debourgogne A**, Dorin J, Machouart M.*

Emerging infections due to filamentous fungi in humans and animals: Only the tip of the iceberg?

Environ Microbiol Rep. 2016; 8(3):332-42.

- A27.** *Le Govic Y, Guyot K, Certad G, Deschildre A, Novo R, Mary C, Sendid B, Viscogliosi E, Favennec L, Dei-Cas E, Fréalle E, Dutoit E; ANOFEL Cryptosporidium National Network.*

Assessment of microscopic and molecular tools for the diagnosis and follow-up of cryptosporidiosis in patients at risk.

Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016; 35(1):137-48.

- A28.** *Bloch M, Cavignaux R, **Debourgogne A**, Dorin J, Machouart M, Contet-Audonneau N.*

From guinea pig to man: Tinea outbreak due to Trichophyton mentagrophytes var. porcellae in pet shops in Nancy (France).

J Mycol Med. 2016; 26(3):227-32.

- A29.** *Argy N, Bertin GI, Milet J, Hubert V, Clain J, Cojean S, Houzé P, Tuikue-Ndam N, Kendjo E, Deloron P, Houzé S; CNRP Study Group.*

Preferential expression of domain cassettes 4, 8 and 13 of Plasmodium falciparum erythrocyte membrane protein 1 in severe malaria imported in France.

Clin Microbiol Infect. 2017; 23(3):211.e1-211.e4.

- A30.** *Lanternier F, Amazzough K, Favennec L, Mamzer-Bruneel MF, Abdoul H, Turret J, Decramer S, Zuber J, Scemla A, Legendre C, Lortholary O, Bougnoux ME; ANOFEL Cryptosporidium National Network and Transplant Cryptosporidium Study Group.*

Cryptosporidium spp. Infection in Solid Organ Transplantation: The Nationwide "TRANSCRYPTO" Study.

Transplantation. 2017 Apr;101(4):826-830.

- A31.** Dorin J, D'Aveni M, **Debourgogne A**, Cuenin M, Guillaso M, Rivier A, Gallet P, Lecoanet G, Machouart M.
Update on Actinomucor elegans, a mucormycete infrequently detected in human specimens: how combined microbiological tools contribute efficiently to a more accurate medical care.
Int J Med Microbiol. 2017 Dec;307(8):435-442.
- A32.** D'Agostino M, Lemmet T, Dufay C, Luc A, Frippiat JP, Machouart M, **Debourgogne A**.
Overinduction of CYP51A Gene After Exposure to Azole Antifungals Provides a First Clue to Resistance Mechanism in Fusarium solani Species Complex.
Microb Drug Resist. 2018 Jul/Aug;24(6):768-773.
- A33.** Desoubieux G, **Debourgogne A**, Wiederhold NP, Zaffino M, Sutton D, Burns RE, Frasca S Jr, Hyatt MW, Cray C.
Multi-locus sequence typing provides epidemiological insights for diseased sharks infected with fungi belonging to the Fusarium solani species complex.
Med Mycol. 2018 Jul 1;56(5):591-601.
- A34.** Costa D, Razakandrainibe R, Sautour M, Valot S, Basmaciyan L, Gargala G, Lemeteil D; French national network on surveillance of human Cryptosporidiosis, Favennec L, Dalle F.
Human cryptosporidiosis in immunodeficient patients in France (2015-2017).
Exp Parasitol. 2018 Sep;192:108-112.
- A35.** Thomas B, Contet Audonneau N, Machouart M, **Debourgogne A**.

Molecular identification of Fusarium species complexes: Which gene and which database to choose in clinical practice?

J Mycol Med. 2019 Apr;29(1):56-58.

A36. Lefaure B, Kebbab C, Monnin N, Machouart M, **Debourgogne A.**

Evaluation of a Flotation Adapted Parasep® for Stool Ova and Parasite Examination.

J Parasitol. 2019 Jun;105(3):480-483.

A37. Zaffino M, Dubar M, **Debourgogne A,** Bisson C, Machouart M.

Development of a new TaqMan PCR assay for the detection of both Entamoeba gingivalis genotypes.

Diagn Microbiol Infect Dis. 2019 Dec;95(4):114886.

A38. D'agostino M, Tesse N, Frippiat JP, Machouart M, **Debourgogne A.**

Essential Oils and Their Natural Active Compounds Presenting Antifungal Properties.

Molecules. 2019 Oct 15;24(20).

A39. Le Gal S, Toubas D, Totet A, Dalle F, Abou Bacar A, Le Meur Y, Nevez G; Anofel Association.

Pneumocystis Infection Outbreaks in Organ Transplantation Units in France: A Nation-Wide Survey.

Clin Infect Dis. 2019 Oct 21.

A40. Thomas B, Contet Audonneau N, Machouart M, **Debourgogne A.**

Fusarium infections: epidemiological aspects over 10 years

Journal of infection And public health 2020 Jun 21

PUBLICATIONS DIDACTIQUES / CHAPITRE D'OUVRAGES

- *Fiches scientifiques Nouvelle Imagerie Pédagogique de l'Invisible*
Debourgogne A.
iTOP éducation
- *Infections à Fusarium*
Debourgogne A, Hennequin C.
EMC Maladies Infectieuses 2015
- *Infections dues au genre Fusarium*
Debourgogne A, Hennequin C.
EMC Biologie Médicale 2017
- *PodCast Paludisme*
Debourgogne A, Jeanmaire E
Plateforme Université de Lorraine
- *Fiche dermatophytoses*
Fiche ECN ANOFEL
Edition Elsevier 2018
- *Module DPC E-learning sur les bonnes pratiques de prélèvement*
Plateforme d'e-learning DOXACA - CHRU Nancy
2020

COMITE ÉDITORIAL

- *Guide des méthodes et des analyses en Parasitologie Mycologie (ANOFEL)*
Edition Elsevier 2017

SYNTHESE

<i>Journal</i>	<i>Impact Factor (2018)</i>	<i>Année</i>	<i>Rang 1</i>	<i>Rang 2</i>	<i>Autre rang</i>	<i>Dernier rang</i>
<i>Ann Biol Clin</i>	0.503	2007	✓			
		2013		✓		
<i>Clin Infect Dis</i>	9.055	2012			✓	
		2019			✓	
<i>Clin Microbiol Infect</i>	6.425	2010		✓		
		2017			✓	
<i>Diagn Microbiol Infect Dis</i>	2.314	2019			✓	
<i>Emerg Infect Dis</i>	7.42	2014			✓	
<i>Environ Microbio</i>	5.147	2016	✓			
<i>Eur J Clin Microbiol Infect Dis</i>	2.591	2011	✓	✓		
		2016			✓	
<i>Eur J Haematol</i>	2.217	2009		✓		
<i>Exp Parasitol</i>	1.719	2018			✓	
<i>Int J Med Microbiol</i>	3.362	2015		✓		
		2018			✓	
<i>J Bacteriol Parasitol</i>	0.37	2015			✓	
<i>J Clin Microbiol</i>	4.054	2009		✓		
		2011			✓	
		2014	✓			
<i>Journal of Infection and Public health</i>	2.487	2020				✓

<i>J Microbiol Meth</i>	1.803	2010	✓			
		2012	✓			
<i>J Myc Med</i>	1.479	2014	✓			
		2016			✓	
		2019				✓
<i>J Parasitol</i>	1.238	2019				✓
<i>Leuk Lymphoma</i>	2.674	2011			✓	
<i>Med Mycol</i>	2.851	2011	✓			
		2018		✓		
<i>Medicine</i>	1.870	2014			✓	
<i>Microb Drug Resist</i>	2.397	2018				✓
<i>Molecules</i>	3.060	2019				✓
<i>Mycopathologia</i>	2.278	2012		✓		
<i>Mycoses</i>	3.065	2011		✓		
		2012			✓	
		2016			✓	
<i>Paediatrics and International Child Health</i>	1.362	2017	✓			
<i>Rev Iberoam Micol</i>	1.597	2012	✓			
<i>Transplantation</i>	4.743	2017			✓	

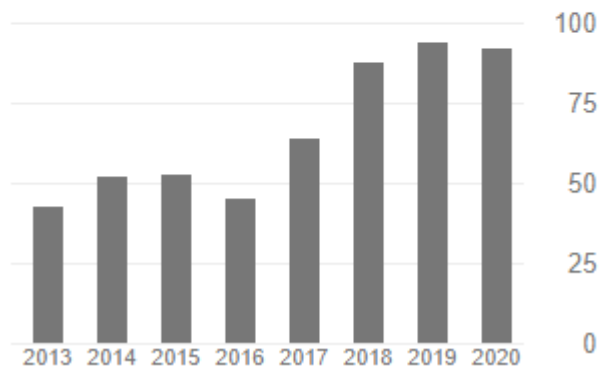
Ma production scientifique s'élève à 40 publications, dont 10 signées en premier auteur et 5 en dernier auteur, 12 communications affichées et 12 communications orales. L'impact factor moyen des publications est de 3.0.

INDICATEURSPoints SIGAPS

445 points

Facteur H

	Toutes	Depuis 2015
Citations	588	436
indice h	13	11
indice i10	18	14



COMMUNICATIONS ORALES

- C1.** Dot JM, **Debourgogne A**, Collomb J, Brizion M, Champigneulle J, Puyhardy JM, Machouart M.
Diagnostic moléculaire d'un cas d'infection disséminée d'adiaspiromycose dû à Emmonsia crescens.
Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Paris, Novembre 2008.
- C2.** **Debourgogne A**, Gueidan C, Hennequin C, Thomarat F, Contet-Audonneau N, de Hoog S, Machouart M.
Développement d'une méthode de typage moléculaire par MultiLocus Sequence Typing appliquée à Fusarium solani.
Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Poitiers, Juin 2009.
- C3.** **Debourgogne A**, Elenga N, Long L, Blanchet D, Toyer AL, Veron V, Simon S, Carme B et Aznar C.
Cryptococcose neuro-méningée chez un enfant non immunodéprimé en Guyane française.
Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Fort de France, Janvier 2010.
- C4.** **Debourgogne A**, Goehringer F, Hénard S, Gauchotte G, May T, Machouart M.
La Mycologie au service de la Parasitologie : diagnostic d'une échinococcose alvéolaire cérébrale primaire par PCR panfongique.
Congrès conjoint de la Société Française & Espagnole de Parasitologie, Dijon, Mai 2013.
- C5.** Persat F, Roussel S, Gay F, Dannaoui E, Foulet F, **Debourgogne A**, Housseine L.
Détection des antigènes aspergillaires par ELISA : quelle est la variabilité observée en routine des références négative et positive du kit Platelia.

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Dijon, Mai 2013.

C6. *Petitnataud D, Contet Audonneau N, Berger S, **Debourgogne A**, Machouart M.*

Optimisation de la stratégie diagnostique des onychomycoses et apport de la biologie moléculaire.

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Dijon, Mai 2013.

C7. *Pianetti C, **Debourgogne A**, Dorin J, Machouart M.*

Place du sérodiagnostic dans les infections fongiques invasives à Candida au CHU de Nancy

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Bordeaux, Mai 2015.

C8. *Thomas B, Contet Audonneau N, Machouart M, **Debourgogne A**.*

Infections à Fusarium sp. : rétrospective des aspects épidémiologiques sur 10 ans au CHRU de Nancy

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Nice, Mai 2018.

C9. *D'Agostino Maurine, Lemmet Thomas, Dufay Claire, Luc Amandine, Frippiat Jean Pol, Machouart M, **Debourgogne A**.*

Surexpression du gène CYP51A chez le complexe d'espèces Fusarium solani après exposition à des antifongiques azolés

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Nice, Mai 2018.

CONFÉRENCES INVITÉES

11. Debourgogne A.

Actualités 2014 en thérapeutique.

Session Big Five

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Paris, Novembre 2014.

12. Debourgogne A, Machouart M.

Epidémiologie et diagnostic des principales mycoses émergentes

Session : Nouveaux challenges en mycologie : pathogène émergents et antifungal stewardship

Journées Nationales d'Infectiologie, Nancy, Juin 2015

13. Debourgogne A.

Actualités sur les résistances acquises aux antifongiques.

Semaine Santé Lorraine, Nancy, Avril 2019.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

- P1.** *Debourgogne A, Grenouillet F, Contet-Audonneau N, Machouart M, Biava MF, Mathias E, Langeron V, Fortier B.*

Identification rétrospective de Candida dubliniensis parmi les souches de Candida albicans isolées de prélèvements profonds et superficiels chez des patients immunodéprimés VIH ou non.

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Nancy, Mai 2007.

- P2.** *Mathias E, Etienne G, Debourgogne A, Machouart M, Biava MF, Fortier B, Contet-Audonneau N.*

Les agents des teignes du cuir chevelu. Evolution épidémiologique à 20 années d'intervalle.

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Nancy, Mai 2007.

- P3.** *Machouart M, Contet-Audonneau N, Poisson DM, Esteve E, Debourgogne A, Mathias E, Fortier B.*

Epidémiologie moléculaire de souches de Trichophyton tonsurans isolées d'une épidémie dans une école maternelle et chez des judokas.

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Nancy, Mai 2007.

- P4.** *Avenel S, Debourgogne A, Machouart M.*

Diagnostic des infections à Pneumocystis jirovecii : de la microscopie à la biologie moléculaire.

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Paris, Novembre 2011.

- P5.** *Dorin J, Filippetti L, Debourgogne A, Voilliot D, Huttin O, Machouart M*

Atteinte cardiaque atypique dans un contexte d'hyperéosinophilie : à propos d'un cas de toxocarose

Congrès de la Société Française de Parasitologie, Bordeaux, Mai 2015.

P6. Decker J, **Debourgogne A**, Derelle J, Dorin J, Machouart M.

ABPA et mucoviscidose : place du Western Blot dans la démarche diagnostique

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Bordeaux, Mai 2015.

P7. Dorin J, **Debourgogne A**, Zaidi M, Bazard MC, Machouart M.

Metarhizium anisopliae : à propos d'un cas rare de kératite fongique invasive

Congrès de la Société Française de Mycologie Médicale, Bordeaux, Mai 2015.

P8. Kebbabi C, Prin Matthieu C, Dorin J, Machouart M, **Debourgogne A**.

Comparaison de trois techniques de sérologie toxoplasmose IgG et IgM (ARCHITECT Toxo ABBOTT, LIAISON® Toxo DiaSorin, ENZYGNOST® Toxoplasmosis SIEMENS) lors de la grossesse

Congrès de la Société Française de Parasitologie, Grenoble, Mars 2016.

P9. Lefaure B, Kebbabi C, Monnin N, Machouart M, **Debourgogne A**.

Evaluation du dispositif Parasep® pour l'examen parasitologique des selles par méthode de concentration et de flottation

Congrès de la Société Française de Parasitologie, Grenoble, Mars 2016.

P10. Dorin J, D'Aveni M, **Debourgogne A**, Cuenin M, Gallet P, Machouart M.

A propos d'un cas rare de sinusite à Actinomucor elegans : contribution des principaux outils diagnostiques pour une prise en charge précoce

Congrès de la Société Française de Mycologie, Toulouse, Mai 2017.

P11. Novy E, Laithier FX, Machouart M, **Debourgogne A**, Albuissou E, Guerci P, Losser MR.

Diagnosis of intra-abdominal candidiasis in critically ill patients with 1,3- β -D-glucan
Congrès de la Société Française de Microbiologie, Paris, Octobre 2018.

P12. *D'Agostino M, Tesse N, Fripiat JP, Machouart M, **Debourgogne A.***

In vitro antifungal effect of plant-based compound CIN-102 on filamentous fungi.
Trends in Medical Mycology, Nice, Octobre 2019.

SOUMISSION DE SEQUENCES (GENBANK)

S1. Debourgogne A, Brizion M, Dot J-M, Champigneulles J, Salles Y, Plenat F, Machouart M.

Emmonsia crescens

FJ214160

S2. Debourgogne A, Rivier A, Jankowski R, Machouart M.

Schizophyllum commune

GQ278933

S3. Rivier A, Debourgogne A, Machouart M.

Candida albicans

GQ337975

S4. Debourgogne A, Rivier A, Machouart M.

Rhizopus oryzae

GQ426950

S5. Debourgogne A, Rivier A, Machouart M.

Rhizopus oryzae

GQ426951

S6. Debourgogne A, Rivier A, Sokolowska-Gillois J, Puyhardy J-M, Machouart M.

Pichia norvegensis

GQ463599

S7. Debourgogne A, Gueidan C, Hennequin C, Contet-Audonneau N, de Hoog S, Machouart M.

Fusarium solani Species Complex

HM804593 to HM804847

S8. Debourgogne A, Rivier A, Machouart M.

Geosmithia argillacea

HQ848389

S9. Debourgogne A, Aznar C.

Cryptococcus gattii

HQ386249

S10. Debourgogne A, Gueidan C, Machouart M.

Fusarium solani Species Complex

JX435123 to JX435272

SOCIETES SAVANTES

- *Société Française de Mycologie Médicale (SFMM)*
- *Société Française de Parasitologie (SFP)*
- *International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM)*
- *Association française des enseignants et praticiens hospitaliers titulaires de parasitologie et mycologie médicales (ANOFEL)*

RELECTEUR INVITE POUR REVUES A COMITE DE LECTURE

- *African Journal of Microbiology Research*
- *Air and Water Borne Diseases*
- *Clinical Ophthalmology*
- *European Journal of Clinical Microbiology*
- *Journal de Mycologie Médicale*
- *Journal of Clinical Microbiology*
- *Journal of Medical Microbiology*
- *Journal of Microbiological Methods*
- *Microbial Drug Resistance*
- *Mycopathologia*
- *Mycoses*
- *Plos One*
- *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*

REFERENCES

1. van Diepeningen AD, de Hoog GS. Challenges in *Fusarium*, a Trans-Kingdom Pathogen. *Mycopathologia*. 2016 Apr;181(3–4):161–3.
2. 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. *Clin Infect Dis*. 2001;33(11):1871.
3. Dupont J, Jacquet C, Denettièrre 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):526–533.
4. Chang DC. Multistate Outbreak of *Fusarium* Keratitis Associated With Use of a Contact Lens Solution. *JAMA J Am Med Assoc*. 2006 Aug 23;296(8):953–63.
5. Cho CT, Vats TS, Lowman JT, Brandsberg JW, Tosh FE. *Fusarium solani* infection during treatment for acute leukemia. *J Pediatr*. 1973 Dec;83(6):1028–31.
6. Dignani MC, Anaissie E. Human fusariosis. *Clin Microbiol Infect*. 2004;10:67–75.
7. 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. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010 Jul 12;54(10):4446–50.
8. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, et al. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect Off Publ Eur Soc Clin Microbiol Infect Dis*. 2014 Apr;20 Suppl 3:27–46.
9. 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*. 2010 Sep;82(3):319–23.
10. 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. *J Clin Microbiol*. 2006 Jun 6;44(6):2186–90.
11. 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. J Clin Microbiol.* 2008 Aug;46(8):2477–90.
12. 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. *J Microbiol Methods [Internet]*. 2012 Jul 17 [cited 2012 Jul 28]; Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22820199>
 13. 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.* 2006 Mar;50(3):917–21.
 14. Nucci M, Anaissie E. *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clin Microbiol Rev.* 2007 Oct 12;20(4):695–704.
 15. 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 Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2012 Apr;31(4):615–8.
 16. 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 Res.* 2009;9(4):626–633.
 17. 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.
 18. Guarro J. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis Off Publ Eur Soc Clin Microbiol.* 2013 Dec;32(12):1491–500.
 19. de Hoog S, Guarro J, Gené J, Figueras M. *Atlas of Clinical Fungi.* 2011.
 20. 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. *J Clin Microbiol.* 2010 Aug 4;48(10):3708–18.
 21. Debourgogne A, Goehring F, Umhang G, Gauchotte G, Hénard S, Boué F, et al. Primary Cerebral Alveolar Echinococcosis: Mycology to the Rescue. *J Clin Microbiol.* 2014 Feb;52(2):692–4.

22. Rosenzweig JA, Abogunde O, Thomas K, Lawal A, Nguyen Y-U, Sodipe A, et al. *Spaceflight and modeled microgravity effects on microbial growth and virulence. Appl Microbiol Biotechnol.* 2010 Jan;85(4):885–91.
23. Vesper SJ, Wong W, Kuo CM, Pierson DL. *Mold species in dust from the International Space Station identified and quantified by mold-specific quantitative PCR. Res Microbiol.* 2008 Aug;159(6):432–5.
24. Schuerger AC. *Microbial contamination of advanced life support (ALS) systems poses a moderate threat to the long-term stability of space-based bioregenerative systems. Life Support Biosphere Sci Int J Earth Space.* 1998;5(3):325–37.
25. Fjallman T, Hall JC. *Antibody engineering--a valuable asset in preventing closed environment epidemics. Acta Astronaut.* 2005 Oct;57(2–8):81–8.
26. Fan J, Urban M, Parker JE, Brewer HC, Kelly SL, Hammond-Kosack KE, et al. *Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function. New Phytol.* 2013 May;198(3):821–35.
27. James JE, Lamping E, Santhanam J, Milne TJ, Abd Razak MF, Zakaria L, et al. *A 23 bp cyp51A Promoter Deletion Associated With Voriconazole Resistance in Clinical and Environmental Isolates of *Neocosmospora keratoplastica*. Front Microbiol.* 2020 Mar 31;11:272.
28. Abou Ammar G, Tryono R, Döll K, Karlovsky P, Deising HB, Wirsal SGR. *Identification of ABC Transporter Genes of *Fusarium graminearum* with Roles in Azole Tolerance and/or Virulence. Yu J-H, editor. PLoS ONE.* 2013 Nov 11;8(11):e79042.
29. Gardiner DM, Stephens AE, Munn AL, Manners JM. *An ABC pleiotropic drug resistance transporter of *Fusarium graminearum* with a role in crown and root diseases of wheat. FEMS Microbiol Lett.* 2013 Nov;348(1):36–45.
30. Qi P-F, Zhang Y-Z, Liu C-H, Zhu J, Chen Q, Guo Z-R, et al. **Fusarium graminearum* ATP-Binding Cassette Transporter Gene FgABCC9 Is Required for Its Transportation of Salicylic Acid, Fungicide Resistance, Mycelial Growth and Pathogenicity towards Wheat. Int J Mol Sci.* 2018 Aug 10;19(8):2351.
31. A Cordeiro R de, Portela FV, Pereira LM, de Andrade AR, de Sousa JK, Aguiar AL, et al. *Efflux pump inhibition controls growth and enhances antifungal susceptibility of *Fusarium solani* species complex. Future Microbiol.* 2020;15:9–20.
32. Morio F, Lombardi L, Butler G. *The CRISPR toolbox in medical mycology: State of the art and perspectives. Hogan DA, editor. PLOS Pathog.* 2020 Jan 16;16(1):e1008201.

33. Ferrara M, Haidukowski M, Logrieco AF, Leslie JF, Mulè G. A CRISPR-Cas9 System for Genome Editing of *Fusarium proliferatum*. *Sci Rep*. 2019 Dec;9(1):19836.
34. Gardiner DM, Kazan K. Selection is required for efficient Cas9-mediated genome editing in *Fusarium graminearum*. *Fungal Biol*. 2018 Feb;122(2–3):131–7.
35. Shi T-Q, Gao J, Wang W-J, Wang K-F, Xu G-Q, Huang H, et al. CRISPR/Cas9-Based Genome Editing in the Filamentous Fungus *Fusarium fujikuroi* and Its Application in Strain Engineering for Gibberellic Acid Production. *ACS Synth Biol*. 2019 Feb 15;8(2):445–54.
36. Wang Q, Cobine PA, Coleman JJ. Efficient genome editing in *Fusarium oxysporum* based on CRISPR/Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Fungal Genet Biol*. 2018 Aug;117:21–9.
37. Wang Q, Coleman JJ. CRISPR/Cas9-mediated endogenous gene tagging in *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol*. 2019 May;126:17–24.
38. Lightfoot JD, Fuller KK. CRISPR/Cas9-Mediated Gene Replacement in the Fungal Keratitis Pathogen *Fusarium solani* var. *petroliphilum*. *Microorganisms*. 2019 Oct 16;7(10):457.

PUBLICATIONS MAJEURES SELECTIONNEES

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Microbiological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jmicmethDevelopment of a new MLST scheme for differentiation of *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) isolatesAnne 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, UMR S945, 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.

1. Introduction

Members of the *Fusarium solani* Species Complex (FSSC) are common saprophytes, frequently isolated from environmental sources such as soil, air and plants. These fungi are also well known as plant, animal and human pathogens and account for approximately two-thirds of all human and animal fusariosis worldwide (De Hoog et al., 2004; Dignani and Anaissie, 2004). During the last decade, *F. solani* has been increasingly reported in humans, causing localised cutaneous infections in immunocompetent hosts (e.g., onychomycosis, keratitis or endophthalmitis), usually associated with trauma (Chang et al., 2006). In immunocompromised patients, superficial or subcutaneous lesions are susceptible to disseminate and induce serious invasive mycoses with a high mortality rate, ranging from 50% to 80% (Nucci and Anaissie, 2007). Presently, *F. solani* has emerged as the second most common opportunistic pathogenic mould (after *Aspergillus*), mainly in patients with haematological malignancies, in recipients of solid organ and allogenic bone

marrow or stem cell transplants (Boutati and Anaissie, 1997; Nucci and Anaissie, 2007). More specifically, neutropenia, lymphopenia, graft-versus host disease, corticosteroid therapy or any other immunosuppressive treatments represent high risk factors for disseminated fusariosis (Guarro and Gene, 1995; Nucci and Anaissie, 2007).

Due to their increasing clinical relevance, several molecular phylogenetic studies have been performed involving sequence typing, restriction fragment length polymorphism and microsatellite analysis (Dyavaiah et al., 2007; Godoy et al., 2004; Mehl and Epstein, 2007; Zhang et al., 2006). Multilocus sequence typing (MLST) is a highly accurate method used to distinguish between isolates of microbial species. MLST was first developed to facilitate studies of epidemiology and population structure in several bacterial populations (Maiden et al., 1998). This method compares nucleotide polymorphisms within five to seven gene regions, traditionally housekeeping genes. The different polymorphisms giving rise to allelic variants are recorded and the resulting combinations correspond to the strain sequence types (ST). Because MLST data can be easily accessible at a global scale through dedicated websites, it has the advantage of allowing multiple users to compare their results. MLST has already been used to investigate

* Corresponding author. Tel.: +33 3 83 15 43 88; fax: +33 3 83 15 43 86.

E-mail address: a.debourgogne@chu-nancy.fr (A. Debourgogne).

populations of human pathogenic fungi, including *Candida albicans* (Bougnoux et al., 2002), *Candida glabrata* (Dodgson et al., 2003), *Candida tropicalis* (Tavanti et al., 2005), *Candida krusei* (Jacobsen et al., 2007), *Cryptococcus neoformans* var. *gattii* (Feng et al., 2008; Meyer et al., 2009), *C. neoformans* var. *grubii* (Litvintseva et al., 2006; Meyer et al., 2009) and *Aspergillus fumigatus* (Bain et al., 2007).

Recently, a three-locus typing scheme has also been developed for the *F. solani* Species Complex that is based on polymorphisms in portions of the internal transcribed spacer region and domains D1 plus D2 of the nuclear large-subunit rRNA, the translation elongation factor 1 alpha gene (EF-1alpha), and the second largest subunit of the RNA polymerase II gene (RPB2). This multilocus method is particularly useful for phylogenetic and taxonomic studies and has led to a new nomenclature of FSSC containing three main clades. Twenty phylogenetically distinct species have thus been found in the medical FSSC clade 3 (Zhang et al., 2006; O'Donnell et al., 2008). By using this typing method, authors theorise that species-level studies using additional phylogenetically informative data may lead to the discovery of unsuspected cryptic species (O'Donnell et al., 2008). In other clinical fungi, MLST schemes have been developed using metabolic genes, for example glyceraldehyde 3P deshydrogenase (Feng et al., 2008) or isocitrate lyase (Tavanti et al., 2005). Although widely used for fungal MLST, these metabolic genes have never been evaluated for the epidemiology of *F. solani*.

In the present study, we aim to evaluate the contribution of 25 genes to specifically differentiate clinical FSSC isolates. A new five-locus MLST scheme has thus been described for the typing of these fungi. Tested over a panel of 51 epidemiologically unrelated strains, the method was shown to be reproducible, generates a stable profile and presents a power of discrimination calculated at 0.991. These characteristics made this method suitable for tracing strains in a hospital context.

2. Materials and methods

2.1. Isolates

Fifty-one epidemiologically unrelated isolates of *F. solani* Species Complex were used in this study. These strains originated from clinical, plant and environmental sources and were obtained from our own collection or provided by collaborators. All strains were deposited at the CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (<http://www.cbs.knaw.nl>). The corresponding collection numbers and the characteristics of all strains are listed in Table 1.

Strains were stored at -80°C in water/glycerol (1/1) and then streaked onto Malt Agar and grown at 30°C until conidia formed.

2.2. Genetic markers

Based on previous MLST studies, we initially selected the sequences of 25 genes used for *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *A. fumigatus* and *C. neoformans*, for which homologues were available in GenBank for several species of *Fusarium* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>) (Bain et al., 2007; Bougnoux et al., 2002; Dodgson et al., 2003; Jacobsen et al., 2007; Litvintseva et al., 2006; Tavanti et al., 2005). These genes code for enzymes involved in metabolic functions, such as isocitrate lyase (ICL), an enzyme unique to the glyoxylate cycle, which catalyses the cleavage of isocitrate to glyoxylate and succinate (Table 1). For each gene, sequences were then aligned using the Alibee program available on the GeneBee website (http://www.genebee.msu.su/services/malign_reduced.html). Pairs of primers were designed in conserved regions of these genes in order to amplify 500- to 700-bp fragments. Both strands of the successfully amplified genes were then sequenced in order to finally reduce the set to gene fragments, which, in combination,

yielded the largest number of different strain types. Primers and corresponding PCR product sizes are described in Table 2.

2.3. DNA extraction

DNA was extracted from cultures by using the High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). The standard protocol was slightly modified by a short pre-treatment: an aliquot of mycelium was suspended in 200 μl of tissue lysis buffer and incubated for 30 min at 37°C in the presence of lyticase (10 U/ μl , final concentration). DNA was then extracted by following the manufacturer's instructions.

2.4. Amplification and nucleotide sequence determination

PCR assays were carried out in 50 μl reaction volumes containing 2 or 5 μl of DNA extract, 0.5 μl of each primer (40 μM), 0.4 μl of Fast Start Taq DNA Polymerase (5 U/ μl), 5 μl of $10\times$ buffer-MgCl₂ and 5 μl of a deoxynucleoside triphosphate mix (2 mM). PCRs were run in a iCycler IQ Thermal cycler (Biorad, France) under the following conditions: an initial 3-min denaturation step at 94°C , followed by 30 cycles of 94°C for 1 min, 59°C for 1 min, and 72°C for 1 min, with a final extension step of 5 min at 72°C . Five microliters of PCR product were electrophoresed in a 2% agarose gel in the presence of ethidium bromide and visualized under UV light. PCR products were purified using the QIAquick PCR purification kit (Qiagen, France) and sequenced on both strands using the amplification primers. Sequencing reactions were performed by using the Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, France) on an ABI PRISM Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems).

2.5. Sequence data analysis

The one-letter code for nucleotides from the International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) nomenclature was used for data analyses. Forward and reverse DNA sequence chromatograms were analysed with the BioEdit software and nucleotide polymorphic sites were then identified within multiple alignments. Numbers were assigned to unique allelic variants for each haploid locus. These numbers were then combined to yield a sequence type. Sequence type identifiers were compiled for all isolates in the Table 1.

2.6. Discriminatory power

The discriminatory power was measured with Simpson's index of diversity, calculated according to Hunter and Gaston's modification (Hunter and Gaston, 1988). This index is based on the probability that two unrelated strains sampled from a test population will be placed into different typing groups. The Simpson's index of diversity must be associated with confidence intervals (Simpson, 1949). The index should be at least 0.95 in order to consider a typing system to have an effective discrimination power (Struelens 1996).

2.7. Stability and reproducibility of the MLST method

The stability of the MLST method was evaluated by sequencing the amplicons obtained using the DNA from the last subculture of the strain *F. solani* CBS 124896 after 10 transfers.

To evaluate the intra-laboratory reproducibility, the DNAs from three different isolates were extracted from three independent cultures and subsequently submitted to the MLST scheme.

Table 1
Characteristics and genotypes of the 51 isolates of *Fusarium solani* species complex tested in the study.

CBS number	Site of isolation	Geographic origin	Allelic variants					Sequence type (ST)
			ACC	ICL	GDP	MDP	SOD	
124633	Nail	France (Nancy)	1	1	1	1	1	1
124894	Skin	France (Paris)	1	2	1	1	2	2
124632	Skin	France (Paris)	2	3	2	2	3	3
124901	Skin	France (Paris)	1	4	1	1	1	4
124631	Nail	France (Paris)	3	5	3	3	4	5
124630	Skin	France (Paris)	2	3	2	2	3	3
124629	Nail	France (Paris)	3	5	3	3	3	6
124895	Skin	France (Paris)	4	6	4	4	3	7
124896	Blood	Belgium	5	7	5	5	5	8
124628	Nail	France (Paris)	3	5	3	3	5	9
124623	Environment	France (Paris)	3	5	3	3	3	6
124889	Nail	France (Paris)	1	8	1	1	1	10
124627	/	/	6	9	2	6	3	11
124890	Nail	France (Nancy)	7	10	6	4	3	12
124897	Skin	Gabon	1	1	7	1	1	13
124891	Skin	Gabon	8	11	8	1	1	14
124898	Skin	Gabon	1	2	1	7	2	15
124892	Nail	Gabon	9	12	9	8	3	16
124899	Nail	Gabon	1	8	1	1	1	10
124893	Nail	France (Limoges)	4	10	6	4	3	17
124900	Foot	France (Limoges)	4	10	6	4	3	17
124626	/	/	3	5	10	3	1	18
125013	/	France (Lille)	5	7	11	9	5	19
124625	Cornea	France (Lille)	3	5	3	3	6	20
124624	Nail	France (Nancy)	3	5	3	3	3	6
102824	Plated litter fragment	Colombia	10	13	3	10	7	21
241.93	Mycetoma	Suriname	11	14	12	11	8	22
115695	/	/	12	5	3	12	9	23
208.29	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Germany	10	13	3	10	7	21
181.29	Potato	Germany	5	7	13	5	5	24
119996	Carrot	Netherlands	4	10	4	4	3	25
119223	Carrot	Spain	13	15	14	13	10	26
118931	Tomato	UK	14	16	2	14	11	27
117481	<i>Liriodendron tulipifera</i>	USA	15	17	15	15	9	28
115659	Potato cultivar Maritta	Germany	16	18	14	16	10	29
165.87	Potato	Denmark	4	10	6	4	3	17
318.73	<i>Trichosanthes dioica</i>	India	17	19	16	17	3	30
222.49	<i>Euphorbia fulgens</i>	Netherlands	18	16	2	7	11	31
231.31	<i>Quercus garyana</i>	USA	5	7	5	5	5	8
121450	Declined grape vine	Syria	6	20	17	6	12	32
115660	Potato	Egypt	19	21	14	18	10	33
115658	Potato	Israel	13	21	14	18	3	34
115045	<i>Calamus Palmae</i>	Hong Kong	20	5	3	19	13	35
166.87	Soil under chestnut tree	USA	21	10	4	4	3	36
109028	Subcutaneous nodule	Switzerland	22	22	18	20	4	37
108942	Big toe	Netherlands	4	10	4	4	3	25
490.63	Man	Japan	1	8	1	1	2	38
224.34	Toe nail	Cuba	3	5	3	3	4	5
112100	Human vocal prosthesis	Belgium	4	6	4	21	3	39
117608	Arm lesion human dermis	Turkey	23	23	19	22	14	40
116746	Hairy head	Ghana	6	24	2	22	14	41

/:unavailable data.

2.8. Nucleotide sequence accession numbers

The DNA sequence data obtained in this study have been deposited in Genbank and the accession numbers are listed in supplemental material (Table A).

3. Results

3.1. Selection of genes for *F. solani* MLST

Amplification of each of the 25 initially selected genes was attempted on 5 isolates. Among them, eight were successfully amplified for *F. solani* strains and then sequenced (Table 2). Five show high variability whereas three were not very variable. Based on this highest inter-strain discrimination, we selected the five most variable loci to build our MLST scheme: FsACC, FsICL, FsGPD, FsMPD and FsSOD that

encode respectively for acetylCoenzyme A carboxylase, isocitrate lyase, glyceraldehyde 3P deshydrogenase, mannitol 1P deshydrogenase and superoxyde dismutase. For each locus, start and stop nucleotidic positions used for mutiple alignment are given in Table 3.

FsSOD showed the highest typing efficiency, distinguishing 14 genotypes for 13 polymorphisms observed (Table 3). FsICL was the least efficient marker with 24 genotypes differentiated for 67 polymorphisms observed.

3.2. Criteria of validation of MLST

Sequences obtained from primary cultures and the 10th sub-cultures were identical and validated the stability of the method.

The reproducibility, which was tested by using three separate isolates, was also confirmed by identical sequences obtained from the corresponding DNA independently extracted.

Table 2
Oligonucleotide primers of the 8 successfully amplified genes. The first 5 genes were selected for the *Fusarium solani* MLST because of their higher variability.

Genes*	Coded proteins	Size	Forward primer	Reverse primer
FsACC	AcetylCoenzyme A carboxylase	683	FsACCF 5'-CTCGTGAGATCATGATCCAGT-3'	FsACCR 5'-GTTGATAACACGGGAGAGCT-3'
FsICL	Isocitrate lyase	626	FsICLF 5'-GGAGGTTGAGGCTGTCAAG-3'	FsICLR 5'-GCTTGGTGAGCTTCATGACA-3'
FsGPD	Glyceraldehyde 3P deshydrogenase	633	FsGPDF 5'-CATGTACGTCGTCGGTGTCA-3'	FsGPDR 5'-CGCTTACTTGGAGGCATCG-3'
FsMPD	Mannitol 1P deshydrogenase	688	FsMPDF 5'-CGTCGAGAACCACCATCACAAA-3'	FsMPDR 5'-ATGGGGTTGCCAATTCGCT-3'
FsSOD	Superoxyde dismutase	479	FsSODF 5'-TGGGACATCACCGTAACGA-3'	FsSODR 3'-CAGTCTTGAGAGACTCTCG-3'
FsTOP1	Topoisomerase I	482	FsTOP1F 5'-AGGAGCACATGACGACCAAG-3'	FsTOP1R 5'-GATCCTGATCAGCCATGATC-3'
FsUGP1	UTP glucose1P uridylyltransferase	582	FsUGP1F 5'-CAGATGCGAAATGCTCTGAC-3'	FsUGP1R 5'-AGGATATCGAGCTTGTGGC-3'
FsHMG	HydroxyMethylGlutarylCoA reductase	569	FsHMGF 5'-GGCAAGATTCCTGGTTACGC-3'	FsHMGR 5'-TTCATACCCATAGCGTCACC-3'

*Amplifications failed for 17 genes; ATP dependant permease (ADP1), Annexin (ANX); Beta 1.3 glucanosyltransferase (BGT1), Catalase (CAT1); Imidazole glycerol P dehydratase (HIS3); Laccase (LAC1); Lipase (LIP); Mating type protein (MAT1-2); Myristoyl CoA transferase (NMT1); Phospholipase (PLB1); 26S proteasome regulatory subunit (RPN2); Alanyl RNA synthetase (SYA1c); Orotidine 5'P decarboxylase (URA3); Urease (URE1); D xylose reductase I ou II (XYR1); Zinc transporter (ZRF2); Putative G6PD (ZWF1alpha).

3.3. Discriminatory power

Simpson's formula applied to the dataset obtained from the 51 typed isolates infers a high discriminatory power of the MLST scheme of 0.991 with confidence intervals $CI_{95\%}$: [0.984; 0.997]. Fig. 1 shows the relation between the variation of diversity index and the number of genes used in the MLST scheme. According to our results, the discriminatory power increased when more genes were included in the scheme (Fig. 1).

Forty one different genotyping profiles have been determined among the 51 selected strains (Table 1).

4. Discussion

Typing methods contribute greatly to the understanding of the epidemiology of infections and the evolution of pathogens. They are therefore important for monitoring infectious disease outbreaks. Two are predominant because of their high level of standardisation: microsatellite and MLST. Among them, MLST has previously been shown to be highly resolutive for epidemiological and population structure analysis of several fungi (Meyer et al., 2009). This technique is based on the identification of nucleotide polymorphisms in several gene regions present in all isolates within a given species. This reproducible method makes the results easy to include in online databases and to analyse with the appropriate software. This should allow longitudinal comparisons of large numbers of isolates and rapid exchanges between different laboratories. In the present study, we evaluated the utility of 25 genes that have previously been used in other fungal MLST schemes for epidemiological purposes. We finally selected five genes for the development of a new MLST scheme for the differentiation of isolates belonging to the *F. solani* Species Complex.

The MLST scheme has been validated according to previous published guidelines on the evaluation of molecular typing methods

(Van Belkum et al., 2007). Our method is characterized by a discriminatory power of 0.991 with $CI_{95\%}$: [0.984; 0.997] and is thus a reliable tool for the typing of FSSC strains. According to Simpson's index calculation illustrated in Fig. 1, our method would have a sufficient discriminatory power (0.95) by using only two genes. Nevertheless, with five genes, the discriminatory power is higher, and this allows the discrimination of isolates that would otherwise have the same sequence type. We anticipate that typing and comparing a higher number of isolates using the five-locus MLST scheme will also lead to identifying additional genotypes of FSSC strains.

Our method, based on the analysis of 1616 nucleotides, is stable, reproducible and able to distinguish between closely related strains and reliable for the typing of FSSC strains. Moreover, the small size of the fragments makes the technique particularly cost-efficient and suitable for non-specialised institutions with simple sequencing facilities, compared to other methods. This new alternative scheme could then be used in cases of outbreaks to highlight the epidemiological relationships between environmental isolates and clinical strains. In our study, some isolates shared the same genotype, as for example, CBS 124630 and CBS 124632 that have been isolated from different patients in the same hospital, suggesting a possible common origin related to a nosocomial infection.

The five-locus scheme differentiates 41 genotypes from a sampling of 51 unrelated strains of *F. solani* Species Complex. This high genetic diversity found here within FSSC is consistent with the literature data,

Table 3
Characteristics of the fragments of the 5 loci studied.

Locus	Sequence start (5')	Sequence end (3')	Size (bp)	No. of variable nucleotidic sites	No of genotypes	No of genotypes/polymorphism
FsACC	GTTGAC	GTACAT	371	54	23	0.43
FsICL	GCTCAG	GCATCC	369	67	24	0.36
FsGPD	AACGTC	GTGACA	355	31	19	0.61
FsMPD	CACGTT	CCTACC	334	47	22	0.47
FsSOD	CAACGG	GTAAGA	187	13	14	1.08

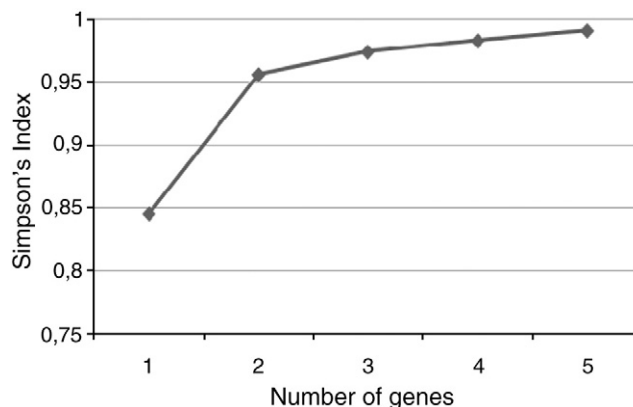


Fig. 1. Relation between the Simpson's index of diversity and the number of genes used to differentiate *F. solani* isolates.

which suggest that the *F. solani* Species Complex includes up to 45 morphologically cryptic phylogenetic species (O'Donnell et al., 2008).

The current reference typing method used for *F. solani* Species Complex based on the combined analysis of polymorphisms found within EF1 α , ITS and RPB2 is well adapted for phylogenetic species recognition (O'Donnell et al., 2008). However, our new MLST scheme might bring more power for the discrimination of isolates within phylogenetic species. A comparative study is currently evaluated in order to compare the discriminatory power of the current three-locus scheme with our new typing method.

Acknowledgments

We are grateful to M. Kombila, M.L. Darde and L. Delhaes for kindly providing isolates included in this study, and to the staff of the CBS collection service for providing and processing isolates. We thank Tiffany Dunham for having checked the English.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.mimet.2010.07.008.

References

- Bain, J.M., Tavanti, A., Davidson, A.D., Jacobsen, M.D., Shaw, D., Gow, N.A., Odds, F.C., 2007. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1469–1477.
- Bougnoux, M.E., Morand, S., d'Enfert, C., 2002. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1290–1297.
- Boutati, E.I., Anaissie, E.J., 1997. *Fusarium*, a significant emerging pathogen in patients with hematologic malignancy: ten years experience at a cancer center and implications for management. *Blood* 90, 999–1008.
- Chang, D.C., Grant, G.B., O'Donnell, K., Wannemuehler, K.A., Noble-Wang, J., Rao, C.Y., Jacobson, L.M., Crowell, C.S., Sneed, R.S., Lewis, F.M., Schaffzin, J.K., Kainer, M.A., Genese, C.A., Alfonso, E.C., Jones, D.B., Srinivasan, A., Fridkin, S.K., Park, B.J., *Fusarium Keratitis Investigation Team*, 2006. Multistate outbreak of *Fusarium* keratitis associated with use of a contact lens solution. *JAMA* 296, 953–963.
- De Hoog, G.S., Guarro, J., Gené, J., Figueras, M.J., 2004. *Atlas of Clinical Fungi*. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands, 2 ed.
- Dignani, M.C., Anaissie, E., 2004. Human Fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect.* 10, 67–75.
- Dodgson, A.R., Pujol, C., Denning, D.W., Soll, D.R., Fox, A.J., 2003. Multilocus sequence typing of *Candida glabrata* reveals geographically enriched clades. *J. Clin. Microbiol.* 41, 5709–5717.
- Dyavaiah, M., Ramani, R., Chu, D.S., Ritterband, D.C., Shah, M.K., Samsonoff, W.A., Chaturvedi, S., Chaturvedi, V., 2007. Molecular characterisation, biofilm analysis and experimental biofouling study of *Fusarium* isolates from recent cases of fungal keratitis in New York State. *BMC Ophthalmol.* 30, 1.
- Feng, X., Yao, Z., Ren, D., Liao, W., Wu, J., 2008. 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.* 8, 930–938.
- Godoy, P., Cano, J., Gené, J., Guarro, J., Höfling-Lima, A.L., Lopes, Colombo A., 2004. Genotyping of 44 isolates of *Fusarium solani*, the main agent of fungal keratitis in Brazil. *J. Clin. Microbiol.* 42, 4494–4497.
- Guarro, J., Gene, J., 1995. Opportunistic fusarial infections in humans. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 14, 741–754.
- Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466.
- Jacobsen, M.D., Gow, N.A., Maiden, M.C., Shaw, D.J., Odds, F.C., 2007. Strain typing and determination of population structure of *Candida krusei* by multilocus sequence typing. *J. Clin. Microbiol.* 45, 317–323.
- Litvintseva, A.P., Thakur, R., Vilgalys, R., Mitchell, T.G., 2006. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics* 172, 2223–2238.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., Spratt, B.G., 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 3140–3145.
- Mehl, H., Epstein, L., 2007. *Fusarium solani* species complex isolates conspecific with *Fusarium solani* f. sp. *curvibitae* race 2 from naturally infected human and plant tissue and environmental sources are equally virulent on plants, grow at 37 °C and are interfertile. *Environ. Microbiol.* 9, 2189–2199.
- Meyer, W., Aanensen, D.M., Boekhout, T., Cogliati, M., Diaz, M.R., Esposto, M.C., Fisher, M., Gilgado, F., Hagen, F., Kaocharoen, S., Litvintseva, A.P., Mitchell, T.G., Simwami, S.P., Trilles, L., Viviani, M.A., Kwon-Chung, J., 2009. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med. Mycol.* 12, 1–14.
- Nucci, M., Anaissie, E., 2007. *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin. Microbiol. Rev.* 20, 695–704.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M.G., Brandt, M.E., Zhang, N., Geiser, D.M., 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and *in vitro* antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2477–2490.
- Simpson, E.H., 1949. Measurement of diversity. *Nature* 163, 688.
- Struelens, M.J., 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* 2, 2–11.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Johnson contribution of these genes Maiden, M.C., Shaw, D.J., Gow, N.A., Odds, F.C., 2005. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5593–5600.
- Van Belkum, A., Tassios, P.T., Dijkshoorn, L., Haeggman, S., Cookson, B., Fry, N.K., Fussing, V., Green, J., Feil, E., Gerner-Smidt, P., Brisse, S., Struelens, M., for the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID) Study Group on Epidemiological Markers (ESGEM), 2007. Guidelines for the validation and application of typing methods for use in bacterial epidemiology. *Clin. Microbiol. Infect.* 13, 1–46.
- Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D.A., Nalim, F.A., Summerbell, R.C., Padhye, A.A., Geiser, D.M., 2006. Members of the *Fusarium solani* Species Complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2186–2190.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



(This is a sample cover image for this issue. The actual cover is not yet available at this time.)

This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at SciVerse 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^c, 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, EF1a, *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.

1. Introduction

Multilocus sequence typing (MLST) is a widely used approach for differentiating microbial isolates (Urwin and Maiden, 2003). This method is based on DNA sequences of multiple loci and directly compares nucleotide polymorphisms. In contrast to electrophoresis typing methods such as RFLP or RAPD, one of the advantages of MLST is the highly objective interpretation of discrete data. Moreover, MLST sequence data can be accessed through online databases (e.g., www.MLST.net or www.pasteur.fr/mlst). These online databases facilitate identification of isolates and comparison of sequence types (ST) for large epidemiological and population studies. For the *Fusarium solani* species complex (FSSC), three loci have been widely used to investigate phylogenetic relationships at the interspecific level (O'Donnell et al., 2008): the internal transcribed spacer region and domains D1/D2 of the large subunit of the nuclear ribosomal RNA gene (ITS-nuLSU), translation elongation factor 1 alpha gene (EF-1 alpha), and the second largest subunit of RNA polymerase II gene (*RPB2*). These markers have been used for phylogenetic and population studies and have led to

new species delimitations within the FSSC as well as to a new haplotype nomenclature system (Zhang et al., 2006; O'Donnell et al., 2008). More recently, a MLST scheme based on polymorphisms was proposed for the FSSC, which employed the five following housekeeping genes: *ACC* (acetylCoenzyme A carboxylase), *ICL* (isocitrate lyase), *GDP* (glyceraldehyde 3P dehydrogenase), *MDP* (mannitol 1P dehydrogenase) and *SOD* (superoxyde dismutase) (Debourgogne et al., 2010).

The aim of this study is to compare the phylogenetic resolution and sequence discriminatory powers of these two sets of loci on 50 epidemiologically unrelated FSSC strains. After considering the characteristics of both gene sets, a third consensus scheme is proposed for typing FSSC strains combining the advantages of the two previous gene sets.

2. Materials and methods

2.1. Isolates

Fifty epidemiologically unrelated isolates of FSSC were used in this study. These strains were isolated from patients, plants and the environment. All strains were deposited at the CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (www.cbs.knaw.nl). The corresponding collection numbers and characteristics of all strains are listed in Table 1. In addition, strains were stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in water/glycerol (1/1) in the laboratory of the

* Corresponding author at: Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpitaux de Nancy, CHU Brabois, 11 allée du Morvan, 54511 Vandœuvre-les-Nancy, France. Tel.: +33 3 83 15 43 92; fax: +33 3 83 15 43 86.

E-mail address: a.debourgogne@chu-nancy.fr (A. Debourgogne).

corresponding author, streaked onto Malt Agar and grown at 30 °C until conidia formed.

2.2. DNA extraction

Genomic DNA was extracted from cultures using the High Pure PCR Template Preparation kit (Roche Diagnostics, Meylan, France). The standard protocol was slightly modified by a short pre-treatment: an aliquot of mycelium was suspended in 200 µL of tissue lysis buffer and incubated for 30 min at 37 °C in the presence of lyticase (10 U/µL, final concentration). DNA was then extracted following the manufacturer's instructions.

2.3. Amplification, sequencing and sequence alignments

PCR assays were carried out in 50 µL reaction volumes containing 2 or 5 µL of DNA extract, 0.5 µL of each primer (40 µM) (Table 2), 0.4 µL of

Fast Start Taq DNA Polymerase (5 U/µL), 5 µL of 10× MgCl₂-buffer, and 5 µL of a 2 mM deoxynucleoside triphosphate mix. PCRs were run in a iCycler IQ Thermal cycler (Biorad, France) under the following conditions: an initial 90 sec denaturation step at 94 °C, followed by 40 cycles of 94 °C for 30 sec, 55 °C for 90 sec, and 68 °C for 2 min, with a final extension step of 5 min at 68 °C. Five microliters of PCR product were electrophoresed in a 2% agarose gel in the presence of ethidium bromide and visualized under UV light. Sequencing reactions were run at Genoscreen (Lille, France). Chromatograms of forward and reverse DNA sequences were analyzed with the BioEdit software (Tippmann, 2004). Manual alignments were performed using MacClade 4.06 (Maddison and Maddison, 2003).

2.4. Phylogenetic species and haplotype designation

A first phylogenetic analysis aimed at placing the FSSC strains used in this study into the phylogenetic species/haplotype framework

Table 1
Strain histories and genotypes of the 50 FSSC isolates tested. Numbers were assigned to unique allelic variants for each haploid locus. These numbers were then combined to yield a sequence type ST. A slash (/) represents unavailable data.

CBS number–species/haplotype	Site of isolation	Geographic origin	Debourgogne scheme						O'Donnell scheme				Consensus scheme	
			ACC	ICL	GDP	MDP	SOD	ST	EF1a	ITS-nuLSU	RPB2	ST	ST	
CBS 124633-FSSC 2-k	Nail	France (Nancy)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
CBS 124894-FSSC 2-d	Skin	France (Paris)	1	2	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2
CBS 124901-FSSC 2-w	Skin	France (Paris)	1	4	1	1	1	4	1	1	2	3	3	3
CBS 124631-FSSC 1-b	Nail	France (Paris)	3	5	3	3	4	5	3	2	3	4	4	4
CBS 124630-FSSC 3 + 4-bbbb	Skin	France (Paris)	2	3	2	2	3	3	4	3	4	5	5	5
CBS 124629-FSSC 1-d	Nail	France (Paris)	3	5	3	3	3	6	5	4	3	6	6	6
CBS 124895-FSSC 5-o	Skin	France (Paris)	4	6	4	4	3	7	6	5	5	7	7	7
CBS 124896-FSSC 11-i	Blood	Belgium	5	7	5	5	5	8	7	6	6	8	8	8
CBS 124628-FSSC 1-b	Nail	France (Paris)	3	5	3	3	5	9	3	2	3	4	9	9
CBS 124623-FSSC 1-b	Environment	France (Paris)	3	5	3	3	3	6	3	2	3	4	10	10
CBS 124889-FSSC 2-d	Nail	France (Paris)	1	8	1	1	1	10	2	1	1	2	11	11
CBS 124627-FSSC 3 + 4-aaaa	/	/	6	9	2	6	3	11	32	3	7	9	12	12
CBS 124890-FSSC 5-v	Nail	France (Nancy)	7	10	6	4	3	12	8	5	8	10	13	13
CBS 124897-FSSC 2-k	Skin	Gabon	1	1	7	1	1	13	1	1	1	1	14	14
CBS 124891-FSSC 2-t	Skin	Gabon	8	11	8	1	1	14	9	1	1	11	15	15
CBS 124898-FSSC 2-d	Skin	Gabon	1	2	1	7	2	15	2	1	1	2	16	16
CBS 124892-FSSC 20-f	Nail	Gabon	9	12	9	8	3	16	10	9	9	12	17	17
CBS 124899-FSSC 2-d	Nail	Gabon	1	8	1	1	1	10	2	1	1	2	11	11
CBS 124893-FSSC 5-nn	Nail	France (Limoges)	4	10	6	4	3	17	11	5	8	13	18	18
CBS 124900-FSSC 5-v	Foot	France (Limoges)	4	10	6	4	3	17	8	5	8	10	19	19
CBS 124626-FSSC 1-a	/	/	3	5	10	3	1	18	3	4	3	14	20	20
CBS 125013-FSSC 11-c	/	France (Lille)	5	7	11	9	5	19	12	10	6	15	21	21
CBS 124625-FSSC 1-a	Cornea	France (Lille)	3	5	3	3	6	20	3	4	3	14	22	22
CBS 124624-FSSC 1-a	Nail	France (Nancy)	3	5	3	3	3	6	3	4	3	14	23	23
CBS 102824-FSSC 25-d	Litter	Colombia	10	13	3	10	7	21	13	11	10	16	24	24
CBS 241.93-FSSC 33-b	Mycetoma	Suriname	11	14	12	11	8	22	14	12	11	17	25	25
CBS 115695-FSSC 18-e	/	/	12	5	3	12	9	23	15	13	12	18	26	26
CBS 208.29-FSSC 25-d	<i>Hyacinthus orientalis</i>	Germany	10	13	3	10	7	21	13	11	10	16	24	24
CBS 181.29-FSSC 11-j	Potato	Germany	5	7	13	5	5	24	17	14	13	20	27	27
CBS 119996-FSSC 5-kk	Carrot	Netherlands	4	10	4	4	3	25	18	15	14	21	28	28
CBS 119223-FSSC 21-f	Carrot	Spain	13	15	14	13	10	26	19	16	15	22	29	29
CBS 118931-FSSC 9-a	Tomato	UK	14	16	2	14	11	27	20	17	16	23	30	30
CBS 117481-FSSC 24-a	<i>Liriodendron tulipifera</i>	USA	15	17	15	15	9	28	21	18	17	24	31	31
CBS 115659-FSSC 21-c	<i>Potato cultivar Maritta</i>	Germany	16	18	14	16	10	29	19	19	18	25	32	32
CBS 165.87-FSSC 5-ll	Potato	Denmark	4	10	6	4	3	17	22	5	19	26	33	33
CBS 318.73-FSSC 3 + 4-zzz	<i>Trichosanthes dioica</i>	India	17	19	16	17	3	30	23	3	20	27	34	34
CBS 222.49-FSSC 9-a	<i>Euphorbia fulgens</i>	Netherlands	18	16	2	7	11	31	20	17	16	23	35	35
CBS 231.31-FSSC 11-k	<i>Quercus garyana</i>	USA	5	7	5	5	5	8	7	10	6	28	36	36
CBS 121450-FSSC 3 + 4-cccc	Grape vine	Syria	6	20	17	6	12	32	24	3	21	29	37	37
CBS 115660-FSSC 21-d	Potato	Egypt	19	21	14	18	10	33	25	20	22	30	38	38
CBS 115658-FSSC 21-e	Potato	Israel	13	21	14	18	3	34	26	21	23	31	39	39
CBS 115045-FSSC ?	<i>Calamus palmae</i>	Hong Kong	20	5	3	19	13	35	27	11	24	32	40	40
CBS 166.87-FSSC 5-mm	Soil under chestnut tree	USA	21	10	4	4	3	36	28	5	8	33	41	41
CBS 109028-FSSC 28-c	Subcutaneous nodule	Switzerland	22	22	18	20	4	37	29	7	25	34	42	42
CBS 108942-FSSC 5-mm	Big toe	Netherlands	4	10	4	4	3	25	30	5	8	35	43	43
CBS 490.63-FSSC 2-d	Man	Japan	1	8	1	1	2	38	2	1	1	2	44	44
CBS 224.34-FSSC 1-b	Toe nail	Cuba	3	5	3	3	4	5	3	2	3	4	4	4
CBS 112100-FSSC 5-ij	Human vocal prosthesis	Belgium	4	6	4	21	3	39	6	5	26	36	45	45
CBS 117608-FSSC 6-f	Arm lesion human dermis	Turkey	23	23	19	22	14	40	31	8	27	37	46	46
CBS 116746-FSSC 6-f	Hairy head	Ghana	6	24	2	22	14	41	31	8	27	37	47	47

Table 2
Primers used for PCR and DNA sequencing.

Locus	Gene product	Forward primer	Reverse primer	Reference
ACC	AcetylCoenzyme A carboxylase	FsACCF	FsACCR	Debourgogne et al., 2010
ICL	Isocitrate lyase	FsICLF	FsICLR	Debourgogne et al., 2010
GPD	Glyceraldehyde 3P deshydrogenase	FsGPDF	FsGPDR	Debourgogne et al., 2010
MPD	Mannitol 1P deshydrogenase	FsMPDF	FsMPDR	Debourgogne et al., 2010
SOD	Superoxyde dismutase	FsSODF	FsSODR	Debourgogne et al., 2010
EF1a	Elongation factor	EF1	EF2	O'Donnell et al., 2008
ITS-nuLSU	Nuclear ribosomal rRNA gene product	ITS5	NL4	O'Donnell et al., 2008
RPB2	RNA polymerase (second largest subunit)	5f2 7cf	7cr 11ar	O'Donnell et al., 2008

established by O'Donnell et al. (2008). The data used for this analysis included 125 strains of FSSC (50 strains from our study and 75 strains for which sequence data was available from GenBank (Supplementary Table 1). The analysis was based on the three genes traditionally used for this species complex: EF1a, ITS-nuLSU and RPB2. The dataset was analyzed using a fast likelihood approach with the software RAXML VI-HPC (Stamatakis et al., 2005, 2008) as implemented on the webserver CIPRES (www.phylo.org). The ML search followed a GTRMIX model of molecular evolution applied to eight partitions (EF1a intron, 1st, 2nd and 3rd codon positions; ITS-nuLSU; and RPB2 1st, 2nd and 3rd codon positions). Support values were obtained in RAXML with a bootstrap analysis of 1000 pseudoreplicates. For the haplotype designation, our 50 isolates were included in a larger dataset comprising EF1a, ITS-nuLSU and RPB2 for a large number of FSSC isolates (O'Donnell, including unpublished data for several isolates) and analyzed using the software Collapse v. 1.2 (available at <http://crandalllab.byu.edu/>). The defaults options were used except for the missing data, which were not counted as differences (option –m).

2.5. Phylogenetic analyses and resolution power

A second set of analyses focused on the 50 FSSC strains newly analyzed in this study and aimed at comparing the phylogenetic resolution between different sets of genes. Three sets of genes were compared: a set including the three gene regions traditionally used for this species complex (O'Donnell three-gene scheme, including EF1a, ITS-nuLSU, RPB2), a set of five markers newly developed for the FSSC (Debourgogne five-gene scheme, including ACC, ICL, GDP, MDP, SOD), and a last set including all eight previously cited gene regions (new consensus method). The datasets were also analyzed using RAXML, with a GTRMIX model of evolution and multiple partitions corresponding to the three codon positions for each protein-coding genes, their introns when present, and ITS-nuLSU. Support values were obtained in RAXML with a bootstrap analysis of 1000 pseudoreplicates. The number of well-supported nodes (bootstrap value $\geq 70\%$) was used to compare the resolving power of these different sets of genes. *Fusarium staphyleae* NRRL 22316 was used as the outgroup.

2.6. Sequence types (ST)

Polymorphic nucleotide sites were identified manually within alignments using the BioEdit software (Tippmann, 2004). Numbers were assigned to unique allelic variants for each haploid locus. These

numbers were then combined to yield a sequence type. Sequence type identifiers were compiled for all isolates in Table 1.

2.7. Discriminatory power

The discriminatory power was measured with Simpson's index of diversity, calculated according to Hunter and Gaston's modification (Hunter and Gaston, 1988). This index is based on the probability that two unrelated strains sampled from a test population are placed into different typing groups. This index was calculated for the O'Donnell et al. (2008) three-gene scheme, the Debourgogne et al. (2010) five-gene scheme, and the new consensus method.

2.8. Typing efficiency

Loci with high and low typing efficiency were identified by estimating their ability to discriminate the highest number of isolates (number of genotype described per polymorphism). The contribution of each locus to the new consensus method was then estimated by examining the effect of excluding each locus from the consensus scheme on the number of sequence types and the discriminatory power.

2.9. Nucleotide sequence accession numbers

DNA sequences reported in this study (EF1 α , ITS-nuLSU, RPB2) have been deposited in GenBank under accession numbers JX435123 to JX435272 (Supplementary Table 1). Sequences of the five other loci have been published previously (Debourgogne et al., 2010) and are available from GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov).

3. Results

3.1. Phylogenetic species and haplotype designation

The first analysis (Fig. 1) shows that all FSSC strains used in this study belong to Clade 3 as defined by Zhang et al. (2006). They are nested in 15 of the 34 different phylogenetic species sampled here. About half of the strains (24) represent new haplotypes (e.g., CBS 241.93 33-b and CBS 231.31 11-k). The other half (26) are genetically identical to previously sampled strains (e.g., CBS 124629 1-d and CBS 117481 24-a). Two or more of our strains were nested within nine previously circumscribed phylogenetic species (FSSC 1, 2, 3, 5, 6, 9, 11, 21, 25).

3.2. Phylogenetic analyses and resolving power

3.2.1. Comparison of phylogenetic resolution

Results of the second set of analyses are presented in Figs. 2–4. The unrooted phylogenies are shown with bootstrap values for nodes supported by $\geq 70\%$. Combined analysis of the newly developed markers (ACC, ICL, GDP, MDP and SOD; Fig. 2) resulted in 26 nodes with a bootstrap value $\geq 70\%$. Analysis of genes traditionally used for the FSSC (EF1a, ITS-nuLSU, RPB2; Fig. 3) resulted in 31 well-supported nodes. When all these eight gene regions were combined (Fig. 4), 30 well-supported nodes were recovered.

3.3. Discriminatory powers and sequence types

3.3.1. Comparison of the O'Donnell and the Debourgogne schemes

Among the 50 FSSC strains, 37 different haplotypes were differentiated by the three-locus O'Donnell typing scheme. Based on this taxon sampling, the calculated discriminatory power of this scheme is 0.980. By using the same taxon sampling, 41 haplotypes were distinguished with the five-locus Debourgogne scheme and this method is characterized by a discriminatory power of 0.991.

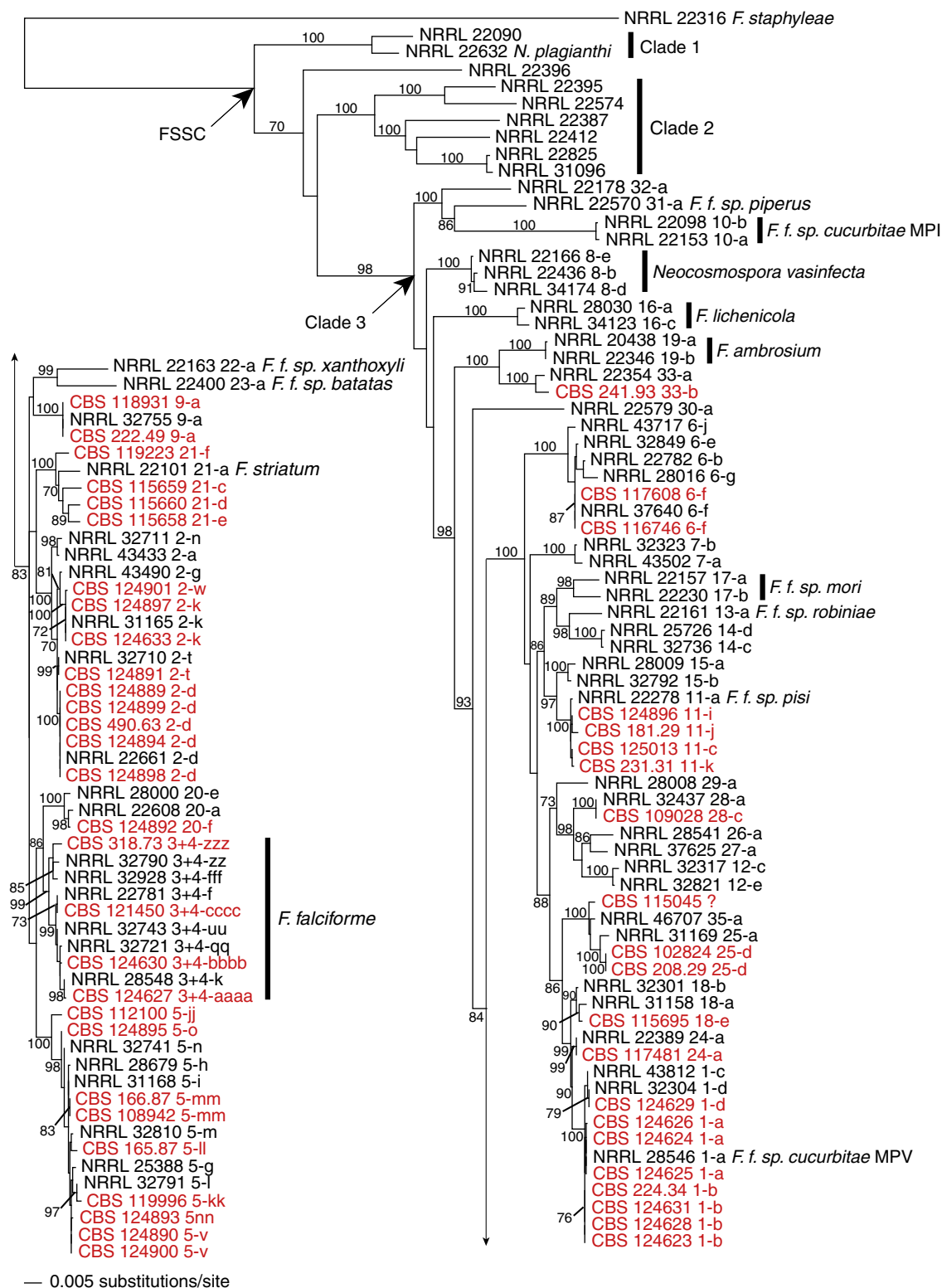


Fig. 1. Phylogenetic placement of 50 FSSC strains typed in this study (in red), in reference to the phylogenetic species as defined by O'Donnell et al. (2008). Most likely tree obtained with RAxML. Bootstrap values $\geq 70\%$ are indicated above or below branches. *Fusarium staphyleae* was used to root the phylogeny. Members of the three clades of FSSC are represented in the tree and species and *Fusarium solani* forma *specialis* (*F. f. sp.*) are indicated where known. The phylogeny has been split in two parts and arrows indicate where the tree should be connected.

Several isolates that shared the same sequence type with the three-locus scheme (O'Donnell et al., 2008) were differentiated with our five-locus scheme (Table 1; Figs. 2 and 3). For example, strains CBS224.34 1-b, CBS124631 1-b and CBS124628 1-b belong to the same sequence type (ST 4) with the three-locus scheme while they

correspond to three different sequence types (ST 5, 9 and 6) with the five-locus scheme. In contrast, strains CBS124629 1-d, CBS124624 1-a represent three sequence types (ST 6, 4 and 14, respectively) with the three-locus scheme but share the same sequence type (ST 6) with the five-gene scheme.



Fig. 2. Unrooted multigenic phylogeny obtained with the 5-locus analysis using newly developed markers (*ACC*, *ICL*, *GDP*, *MDP* and *SOD*). The tree was reconstructed using a maximum likelihood approach with the software RAXML. Support values (above or below branches) were obtained with a bootstrap analysis of 1000 replicates. The 26 significant bootstrap values ($\geq 70\%$) are indicated.

3.3.2. The new consensus FSSC typing scheme

Each of the eight genes was evaluated for its typing efficiency (ability to discriminate the highest number of isolates) by calculating the number of genotypes described per polymorphism (Table 3). The *RPB2* locus shows the lowest typing efficiency (0.12 genotype per polymorphism; Table 3). The typing efficiency of the other loci ranged from 0.23 to 1.08 (Table 3).

The contribution of each locus to the new consensus scheme was determined by calculating the change in number of sequence types and in discriminatory power of the consensus scheme when the tested locus was excluded from it (Table 4). The low contribution of *RPB2* to the typing scheme was confirmed: the number of sequence types (47 sequence type; Table 4) and the discriminatory power (0.998; Table 4) did not change when *RPB2* was removed from the consensus scheme, whereas these two values decreased when any of the other loci were removed.

4. Discussion

In the past, a set of three gene regions (*EF1-a*, *ITS-nuLSU*, *RPB2*) has been used to discriminate phylogenetic species and haplotypes within the FSSC (O'Donnell et al., 2008). A new MLST scheme including five loci has recently been proposed for this species complex (Debourgogne et al., 2010). In this new scheme, we used five house-keeping genes frequently used in MLST schemes for other fungi MLST: *ACC*, used for typing *Candida albicans* (Bougnoux et al., 2002); *ICL*, used for *Candida tropicalis* (Tavanti et al., 2005); *GDP* and *MDP*, used for *Cryptococcus neoformans* (Litvintseva et al., 2006); and *SOD*, used for *Cryptococcus neoformans* and *Aspergillus fumigatus* (Litvintseva et al., 2006; Bain et al., 2007). Here, the three and five locus MLST schemes were compared and, according to Struelens (1996), both schemes are efficient typing methods (discriminatory power superior to 0.95).

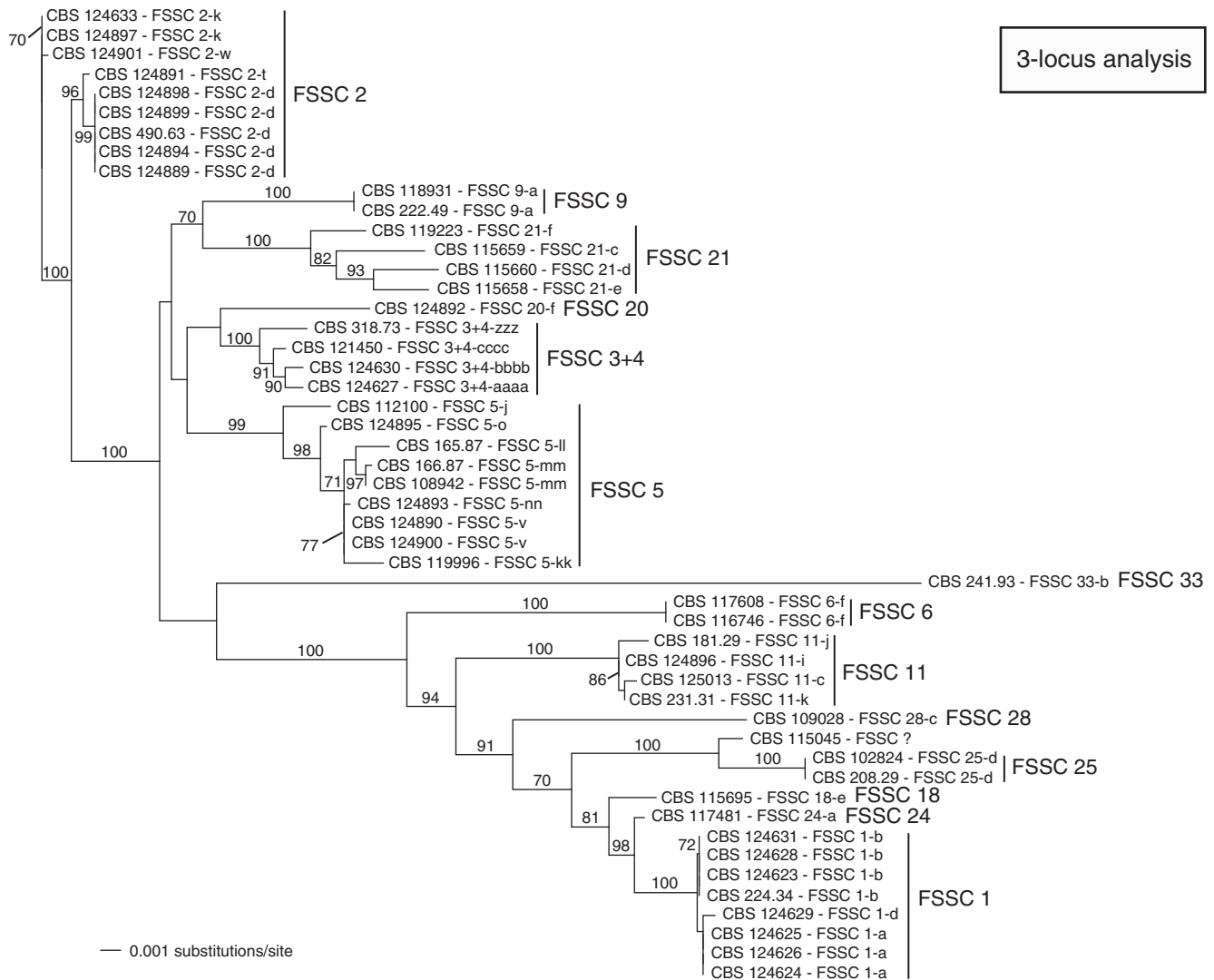


Fig. 3. Unrooted multigenic phylogeny obtained with the three markers traditionally used for the FSSC (EF1a, ITS-nuLSU, *RPB2*). The tree was reconstructed using a maximum likelihood approach with the software RAxML. Support values (above or below branches) were obtained with a bootstrap analysis of 1000 replicates. The 31 significant bootstrap values ($\geq 70\%$) are indicated.

Comparison of the two schemes *via* their discriminatory and phylogenetic resolution and the sequence types highlights their complementarities, and suggests that the most discriminatory loci of each scheme could be combined into a new and better consensus scheme. The contribution of each locus to the consensus scheme was tested: *SOD* was shown to contribute the most to the scheme while the exclusion of *RPB2* did not change the number of sequence types and the discriminatory power. The combination based on eight loci EF1a, ITS-nuLSU, *RPB2*, *ACC*, *ICL*, *GDP*, *MDP*, and *SOD* showed that 47 of the 50 FSSC strains could be distinguished using this consensus scheme, with a discriminatory power of 0.998. The consensus method is thus more discriminating than either of individual schemes as the three-locus scheme only differentiated 37 haplotypes and the five-locus scheme 41 haplotypes.

MLST, originally developed for bacteria, indexes the sequence variation of typically five to ten housekeeping genes (Meyer et al., 2009). Although using as many loci as possible should enhance the discriminatory power of the MLST scheme, it would be pragmatic to achieve the maximal level of differentiation with a minimal set of loci. Although we discovered that *RPB2* does not contribute significantly to the consensus scheme, it has been used in the past to establish the haplotype nomenclature system currently in use and is

therefore critical to the consensus scheme. With eight loci, this scheme offers a high discriminatory power and remains easy to implement, especially now that PCR amplification and sequencing are widely accessible in most laboratories.

Although the MLST scheme with the five newly developed loci show a slightly better discriminatory power than the scheme with the other three markers, use of the latter remains crucial for different purposes. One fundamental purpose is to accurately identify a species or species complex, especially for fungi that are difficult to identify using microscopic observations (Balajee et al., 2009). For this purpose, the need is for markers for which extensive online sequence databases are already available. For the FSSC, these markers are EF1a and *RPB2*, which are available in Fusarium-ID (www.isolate.fusariumdb.org) and Fusarium MLST databases (www.cbs.knaw.nl/fusarium/BioloMICS.aspx). Another purpose is to infer phylogenetic relationships between strains in order to investigate their evolutionary history. For this purpose, molecular markers need to provide phylogenetic resolution and support. For the FSSC, *RPB2*, EF1a and ITS-nuLSU thus far are the best phylogenetic markers available. Therefore, although the newly developed set of loci significantly improves typing of FSSC strains, they will not replace the molecular markers previously used within the FSSC.

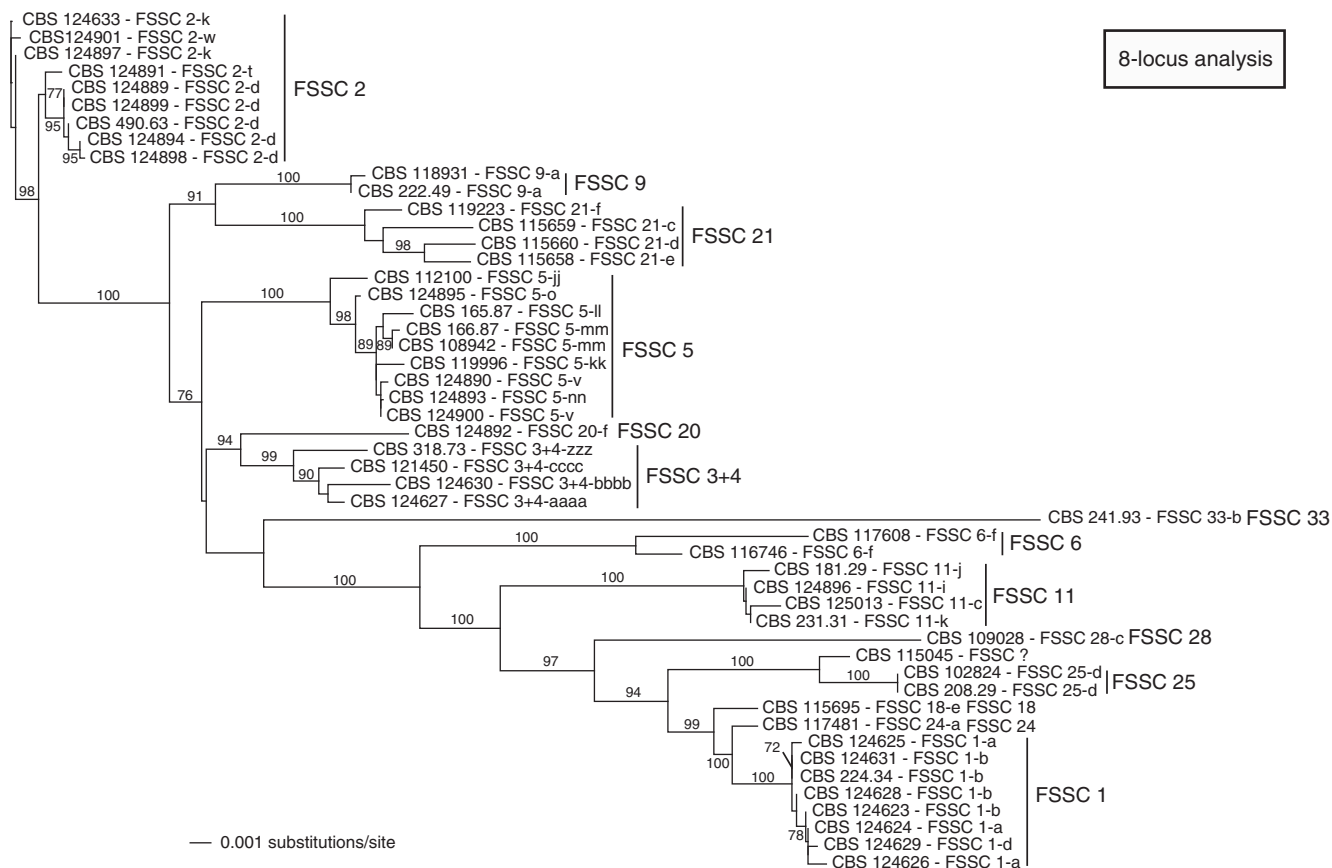


Fig. 4. Unrooted multigenic phylogeny obtained with the eight combined gene regions (*ACC*, *ICL*, *GDP*, *MDP* and *SOD*, *EF1a*, *ITS-nuLSU*, *RPB2*). The tree was reconstructed using a maximum likelihood approach with the software RAXML. Support values (above or below branches) were obtained with a bootstrap analysis of 1000 replicates. The 30 significant bootstrap values ($\geq 70\%$) are indicated.

Table 3
Characteristics of the eight loci sampled.

Locus	Sequence start (5')	Sequence end (3')	size (bp)	No. of variable nucleotide sites	No of haplotypes	No of haplotypes/polymorphism
<i>ACC</i>	GTTGAC	GTACAT	371	54	23	0.43
<i>ICL</i>	GCTCAG	GCATCC	369	67	24	0.36
<i>GPD</i>	AACGTC	GTGACA	355	31	19	0.61
<i>MPD</i>	CACGTT	CCTACC	334	47	22	0.47
<i>SOD</i>	CAACGG	GTAAGA	187	13	14	1.08
<i>EF1a</i>	TCGTGC	ACCGTG	716	133	31	0.23
<i>ITS-nuLSU</i>	CCGAGT	TGTTAT	986	71	21	0.30
<i>RPB2</i>	TACACC	GTTCTT	1738	221	27	0.12

Table 4
Contribution of each locus to new 8-gene consensus scheme. Number of sequence types and discriminatory power were recalculated when each locus was excluded from the consensus scheme. Original values for the 8-gene consensus scheme are indicated in bold in the last row of the table.

MLST consensus scheme	No of sequence types	Discriminatory power
Without <i>ACC</i>	46	0.997
Without <i>ICL</i>	46	0.997
Without <i>GPD</i>	46	0.997
Without <i>MPD</i>	45	0.995
Without <i>SOD</i>	43	0.991
Without <i>EF1a</i>	45	0.996
Without <i>ITS-nuLSU</i>	45	0.996
Without <i>RPB2</i>	47	0.998
All 8 loci included	47	0.998

Supplementary related to this article can be found online at doi:10.1016/j.jmimet.2012.07.012.

Acknowledgments

We would like to thank Kerry O'Donnell for his helpful comments on the manuscript and Stacy Sink for her help with the haplotype designations.

Potential conflicts of interest: all authors: no conflicts.

References

Bain, J.M., Tavanti, A., Davidson, A.D., Jacobsen, M.D., Shaw, D., Gow, N.A., Odds, F.C., 2007. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J. Clin. Microbiol.* 45, 1469–1477.

Balajee, S.A., Borman, A.M., Brandt, M.E., Cano, J., Cuenca-Estrella, M., Dannaoui, E., Guarro, J., Haase, G., Kibbler, C.C., Meyer, W., O'Donnell, K., Petti, C.A., Rodriguez-Tudela, J.L., Sutton, D., Velegriaki, A., Wickes, B.L., 2009. 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.* 47, 877–884.

Bougnoix, M.E., Morand, S., d'Enfert, C., 2002. Usefulness of multilocus sequence typing for characterization of clinical isolates of *Candida albicans*. *J. Clin. Microbiol.* 40, 1290–1297.

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

Hunter, P.R., Gaston, M.A., 1988. Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's Index of Diversity. *J. Clin. Microbiol.* 26, 2465–2466.

Litvinseva, A.P., Thakur, R., Vilgalys, R., Mitchell, T.G., 2006. Multilocus sequence typing reveals three genetic subpopulations of *Cryptococcus neoformans* var. *grubii* (Serotype A), including a unique population in Botswana. *Genetics* 172, 2223–2238.

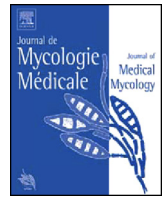
Maddison, W.P., Maddison, D.R., 2003. MacClade: analysis of phylogeny and character evolution. Version 4.6. Sinauer, Sunderland, Massachusetts.

- Meyer, W., Aanensen, D.M., Boekhout, T., Cogliati, M., Diaz, M.R., Esposto, M.C., Fisher, M., Gilgado, F., Hagen, F., Kaocharoen, S., Litvintseva, A.P., Mitchell, T.G., Simwami, S.P., Trilles, L., Viviani, M.A., Kwon-Chung, J., 2009. Consensus multi-locus sequence typing scheme for *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. *Med. Mycol.* 12, 1–14.
- O'Donnell, K., Sutton, D.A., Fothergill, A., McCarthy, D., Rinaldi, M.G., Brandt, M.E., Zhang, N., Geiser, D.M., 2008. Molecular phylogenetic diversity, multilocus haplotype nomenclature, and *in vitro* antifungal resistance within the *Fusarium solani* species complex. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2477–2490.
- Stamatakis, A., Ludwig, T., Meier, H., 2005. A fast program for maximum likelihood-based inference of large phylogenetic trees. *Bioinformatics* 21, 456–463.
- Stamatakis, A., Hoover, P., Rougemont, J., 2008. A rapid bootstrap algorithm for the RAxML web-servers. *Syst. Biol.* 75, 75871.
- Struelens, M.J., 1996. Consensus guidelines for appropriate use and evaluation of microbial epidemiologic typing systems. *Clin. Microbiol. Infect.* 2, 2–11.
- Tavanti, A., Davidson, A.D., Johnson, E.M., Maiden, M.C., Shaw, D.J., Gow, N.A., Odds, F.C., 2005. Multilocus sequence typing for differentiation of strains of *Candida tropicalis*. *J. Clin. Microbiol.* 43, 5593–5600.
- Tippmann, H.F., 2004. Analysis for free: comparing programs for sequence analysis. *Brief. Bioinform.* 5, 82–87.
- Urwin, R., Maiden, M.C., 2003. Multi-locus sequence typing: a tool for global epidemiology. *Trends Microbiol.* 11, 479–487.
- Zhang, N., O'Donnell, K., Sutton, D.A., Nalim, F.A., Summerbell, R.C., Padhye, A.A., Geiser, D.M., 2006. Members of the *Fusarium solani* species complex that cause infections in both humans and plants are common in the environment. *J. Clin. Microbiol.* 44, 2186–2190.



Available online at
ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France
EM|consulte
www.em-consulte.com



Short communication

Molecular identification of *Fusarium* species complexes: Which gene and which database to choose in clinical practice?



Benoît Thomas^{a,c}, Nelly Contet Audonneau^a, Machouart Marie^{a,b}, Anne Debourgogne^{a,b,*}

^a Laboratoire de parasitologie mycologie, CHRU de Nancy, université de Lorraine, 54000 Nancy, France

^b SIMPA, université de Lorraine, 54000 Nancy, France

^c Laboratoire de biologie médicale, hôpitaux privés de Metz, 13, rue de la gendarmerie, 57000 Metz, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 October 2018

Received in revised form 7 January 2019

Accepted 8 January 2019

Available online 28 January 2019

Keywords:

Fusarium species complex

Molecular identification

Fusarium MLST

EF1 α

ABSTRACT

Identification of *Fusarium* at the level of the species complex is difficult with phenotypic methods, so it is necessary to use molecular sequencing methods. This study presents, for 33 isolates distributed among the four major species complexes, the performance of five identification schemes involving *ITS* (internal transcribed spacer), *EF1 α* (translation elongation factor 1 alpha), *RPB1* (largest subunit of RNA polymerase) and *RPB2* (second largest subunit of RNA polymerase) genes and two databases: GenBank and *Fusarium* MLST (MultiLocus Sequence Typing). In our practice, the identification of the fungus from a culture is performed with *EF1 α* and from a primary sample with *ITS*, using in both cases the specific database *Fusarium* MLST.

© 2019 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

Fusarium species are molds that are widely distributed in the environment, including water and soil, and are significant plant pathogens [1]. In immunocompetent patients, the genus *Fusarium* causes exclusively localized pathology; however, in immunocompromised hosts, principally burn and hematological patients, the infections are local or invasive [2]. Clinical presentations of invasive fusariosis are: fungemia, cutaneous infection, pulmonary disease or other rare infections (endocarditis, osteomyelitis, etc.) [3–5]. All drugs used in clinical practice have shown poor in vitro activity against *Fusarium*, which is why these pathologies have a high mortality rate [6,7]. The genus *Fusarium* is divided into phylogenetic species complexes. Those most frequently involved in human infections are *Fusarium solani* species complex (FSSC), *Fusarium oxysporum* species complex (FOSC), *Fusarium dimerum* species complex (FDSC), *Gibberella fujikuroi* species complex (GFSC), and *Fusarium incarnatum* – *Fusarium equiseti* species complex (FIESC) [6]. These different complexes have macroscopic and microscopic culture traits that are quite similar, making it difficult to identify species complexes with phenotypic methods

[8]. As a result, it is necessary to use molecular biology methods for the identification of species complexes. Currently, the recommended identification scheme is based on the sequencing of 3 genes: *EF1 α* (translation elongation factor 1 alpha), *RPB1* (largest subunit of RNA polymerase) and *RPB2* (second-largest subunit of RNA polymerase) [9]. In daily laboratory practice, this scheme can be cumbersome. In current practice, the identification of species complexes can take place following isolation of *Fusarium* in culture, and also directly on primary samples (biopsies, for example) having benefited from a pan-fungal PCR in the context of an invasive fungal infection.

In this study, we compared the performance in terms of identification of four genes commonly used for identification (*ITS*, *EF1 α* , *RPB1* and *RPB2*), as well as two databases (GenBank and *Fusarium* MLST), in order to propose an optimal methodology for identifying complexes of *Fusarium* species on culture or primary sampling.

2. Materials and methods

2.1. Isolates

Thirty-three clinical isolates of the genus *Fusarium* from different locations (nails, corneas or blood cultures) were studied, distributed among the four main species complexes: 19 (58%) FOSC; 10 (30%) FSSC; 3 (9%) GFSC and 1 (3%) FDSC.

* Corresponding author. Service de parasitologie mycologie, hôpitaux de Brabois, CHRU de Nancy, 11, allée du Morvan, 54511 Vandœuvre-les-Nancy, France.

E-mail address: a.debourgogne@chru-nancy.fr (A. Debourgogne).

Table 1
Comparison of the performances of the different identification schemes: gene/database.

	<i>F. oxysporum</i> species complex (n = 19)	<i>F. solani</i> species complex (n = 10)	<i>G. fujikuroi</i> species complex (n = 3)	<i>F. dimerum</i> species complex (n = 1)
<i>ITS/GenBank</i>				
Maximum similarity (%)	100	100	100	99
Median similarity (%)	100	99.6	99.67	99
Minimum similarity (%)	100	99.6	99.67	99
Number of different answers of the first order	1.21	2.80	4.33	1.00
Number of different responses of the 20 occurrences	1.21	3.30	6.33	2.00
<i>ITS/Fusarium MLST</i>				
Maximum similarity (%)	99.99	99.98	99.77	99.62
Median similarity (%)	99.57	99.73	98.68	99.62
Minimum similarity (%)	93.04	99.26	91.81	99.62
Number of different answers of the first order	1.21	1.00	1.00	1.00
Number of different responses of the 20 occurrences	3.00	1.00	2.00	1.00
<i>EF1/Fusarium MLST</i>				
Maximum similarity (%)	99.97	99.83	99.61	99.83
Median similarity (%)	99.33	98.71	93.27	99.83
Minimum similarity (%)	99.21	97.91	92.80	99.83
Number of different answers of the first order	1.00	1.00	1.00	1.00
Number of different responses of the 20 occurrences	1.05	1.00	1.67	1.00
<i>RPB1/Fusarium MLST</i>				
Maximum similarity (%)	99.56	97.63	99.35	99.73
Median similarity (%)	96.66	85.85	95.87	80.55
Minimum similarity (%)	95.04	84.41	94.79	79.93
Number of different answers of the first order	1.00	1.00	1.00	1.00
Number of different responses of the 20 occurrences	5.00	9.90	5.00	7.00
<i>RPB2/Fusarium MLST</i>				
Maximum similarity (%)	99.73	99.86	98.75	100.00
Median similarity (%)	95.54	98.24	96.20	82.43
Minimum similarity (%)	95.14	96.93	95.32	82.13
Number of different answers of the first order	1.00	1.00	1.00	1.00
Number of different responses of the 20 occurrences	6.00	1.00	4.67	2.00

For each identification condition and each species complex, the average percentage of similarity (maximum, median and minimum), the number of different responses from the first order and the total number of different responses are given.

2.2. Sequence analysis

After 5 days of culture on MALT medium, DNA extraction was carried out from the mycelium using the QIAamp DNA Mini Kit[®] (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations.

The *ITS* (internal transcribed spacer) gene was sequenced by primers ITS1 and ITS4 [10] and the sequences obtained were analyzed with Blast, the GenBank database (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) and also with a specific database of the genus *Fusarium*, CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre's *Fusarium* MLST website (<http://www.westerdijkinstituut.nl/Fusarium>). The sequences of the 3 genes, *EF1α*, *RPB1* and *RPB2*, were carried out according to the O'Donnell team protocols and analyzed with a specific database [9].

2.3. Performance indicators

In this work, 5 identification schemes were evaluated: *ITS/GenBank*; *ITS/Fusarium MLST*; *EF1α/Fusarium MLST*; *RPB1/Fusarium MLST* and *RPB2/Fusarium MLST*.

For each of the isolates and each scheme used, only the first 20 occurrences or identification responses were considered. Thus, several indicators were analyzed and compared: the percentage of minimum, median and maximum similarity, the number of different total responses (of the 20 occurrences) and the number of different responses of the first order (namely, the highest percentage of sequence similarity). Ideally, the optimal identification scheme should have high percentages of similarities, close to 100%, and the numbers of different responses close to 1.

3. Results

For the 33 isolates studied, the five schemes described identified the same species complex with varying performance.

For the four species complexes studied, the performances of each of the genes studied/database pairs are shown in Table 1.

We observed that the identification performance of *ITS*, *RPB1* and *RPB2* genes depended on the species complex to be identified. For example, *RPB2* analysis with *Fusarium MLST* was indicative for FSSC, but much less so for FOFC or GFSC. In contrast, *EF1α* was the most versatile gene; its performance was less variable, depending on the species complexes studied, with an average number of responses for the first 20 occurrences between 1 and 1.67. The numbers of different first order responses of the *ITS* gene with the GenBank database was high for the FSSC and GFSC complexes, respectively 2.80 and 4.33. In contrast, the numbers of different first-order responses for all genes with the specific *Fusarium MLST* base were close to 1. The numbers of different responses among the 20 occurrences were low:

- with *EF1α*, regardless of the species complex (≤ 1.67);
- with *ITS* and GenBank database for FOFC (1.21);
- with *ITS* and the specific database for all the studied complexes (1.00 or 2.00) except FOFC (3.00).

The numbers were elevated for all complexes with *RPB1* and *RPB2* genes (up to 9.90) (except FSSC and *RPB2*).

4. Discussion

The universal approach for identifying a fungus with a molecular method relies on the sequencing of the *ITS* gene [11]. However, using this target and the GenBank database, unambiguous identification cannot always be assured. Indeed, several identifications of species or species complexes can be proposed with the same high percentage of similarity. Also, partial identifications, such as *Fusarium* sp., are often reported. Finally, responses are rarely presented according to the complexes described. Thus, this scheme is not considered optimal for the identification of *Fusarium* species complexes.

As a result, specific genes and a database dedicated to the identification of *Fusarium* species complexes have been proposed [9]. A multigene analysis makes it possible to identify the subtype within each complex. However, the analysis of a single gene leads to a complex. RPB1 and RPB2 have a lower occurrence number for high percentages, suggesting a less-supplied database. EF1 α meets the expectations of our performance indicators. In addition, the smaller size of EF1 α allows one-piece sequencing for laboratories with modest equipment.

It is important to note that the performance of the *ITS* gene is improved when analyzing these sequences with the specific *Fusarium* MLST database.

This study establishes identification strategies in current practice that combine analytical performance and technical efficiency (time and cost). Thus, for the identification of the species complex of a *Fusarium* fungus obtained in culture, it is necessary to carry out a sequencing of the *EF1 α* gene and an analysis on the basis of the specific database *Fusarium* MLST, as recommended by the O'Donnell team [9]. On the other hand, when the laboratory carries out a pan-fungal PCR on primary sampling (biopsy of cutaneous necrosis or ophthalmological sampling in the context of a keratitis), it is not necessary to resort to a second sequencing; the analysis of the *ITS* sequence with the specific database will allow a quality diagnosis of the species complex.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgments

We are grateful to the staff members in the Parasitology and Mycology Laboratory Nancy for their participation.

References

- [1] Nelson PE, Dignani MC, Anaissie EJ. Taxonomy, biology, and clinical aspects of *Fusarium* species. *Clin Microbiol Rev* 1994;7:479–504.
- [2] Nucci M, Anaissie E. Emerging fungi. *Infect Dis Clin North Am* 2006;20:563–79.
- [3] Sierra-Hoffman M, Paltiyevich-Gibson S, Carpenter JL, Hurley DL. *Fusarium* osteomyelitis: case report and review of the literature. *Scand J Infect Dis* 2005;37:237–40.
- [4] Nucci F, Nouér SA, Capone D, Anaissie E, Nucci M. *Fusariosis*. *Semin Respir Crit Care Med* 2015;36:706–14.
- [5] Kassari O, Charfi M, Trabelsi H, Hammami R, Elloumi M. *Fusarium solani* endocarditis in an acute leukemia patient. *Med Mal Infect* 2016;46:57–9.
- [6] Guarro J. *Fusariosis*, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2013;32:1491–500.
- [7] 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;31:615–8.
- [8] de Hoog S, Guarro J, Gené J, Figueras M. *Atlas of clinical fungi*; 2011.
- [9] 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. *J Clin Microbiol* 2010;48:3708–18.
- [10] Debourgogne A, Goehringer F, Umhang G, Gauchotte G, Hénard S, Boué F, et al. Primary cerebral alveolar echinococcosis: mycology to the rescue. *J Clin Microbiol* 2014;52:692–4.
- [11] van Diepeningen AD, Brankovics B, Iltes J, van der Lee TAJ, Waalwijk C. Diagnosis of *Fusarium* infections: approaches to identification by the clinical mycology laboratory. *Curr Fungal Infect Rep* 2015;9:135–43.

*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**

**European Journal of Clinical
Microbiology & Infectious Diseases**

ISSN 0934-9723
Volume 31
Number 4

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



Your article is protected by copyright and all rights are held exclusively by Springer-Verlag. This e-offprint is for personal use only and shall not be self-archived in electronic repositories. If you wish to self-archive your work, please use the accepted author's version for posting to your own website or your institution's repository. You may further deposit the accepted author's version on a funder's repository at a funder's request, provided it is not made publicly available until 12 months after publication.

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

Received: 27 April 2011 / Accepted: 10 June 2011 / Published online: 9 July 2011
© Springer-Verlag 2011

Introduction

Fusarium spp. are ubiquitous fungi that are widely distributed in soil, different organic substrates and plants. They are important pathogens and are responsible for significant economic loss. These fungi are also increasingly associated with human disease and now represent the second most frequent cause of invasive mould infection in immunosuppressed patients [1]. The genus *Fusarium* contains a large number of species, and the most common human pathogens belong to the *Fusarium solani* species complex (FSSC). They are isolated in approximately half of reported infections and cause high morbidity and mortality. *Fusarium* spp. are resistant in vitro to many antifungals; amongst them, FSSC is considered to be the least

susceptible [2]. The management of fusariosis is still not well defined; antifungals alone or in combination with other measures, such as surgery or colony-stimulating factors, have been used to treat these infections. Today, according to Nucci and Anaissie, high-dose amphotericin B, combined or not with voriconazole, and reduction of underlying immunosuppression are recommended to treat invasive fusariosis [1]. The aim of this study was to evaluate the in vitro activity of amphotericin B and voriconazole, the most commonly used therapeutics in clinical practice, against a panel of clinical and environmental strains of FSSC. In addition, both methods of susceptibility testing were compared. The Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M38-A2 method is considered the reference method [3] and the E-test is a technique often used in medical laboratories.

A. Debourgogne (✉) · M. Machouart
Service de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nancy,
Hôpitaux de Brabois,
11 allée du Morvan,
54511 Vandœuvre-les-Nancy, France
e-mail: a.debourgogne@chu-nancy.fr

A. Debourgogne · A. Lozniewski · M. Machouart
Département de Microbiologie, EA4369 Relations Hôtes
Environnement Micro-organismes, Faculté de Médecine,
9 avenue de la Forêt de Haye,
54505 Vandœuvre-les-Nancy, France

S. de Hoog
CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre,
P.O. Box 85167, 3508 AD Utrecht, Netherlands

A. Lozniewski
Service de Bactériologie, CHU de Nancy, Hôpital Central,
Avenue Maréchal de Lattre de Tassigny,
54000 Nancy, France

Materials and methods

Strains

Forty-eight isolates of FSSC were used in this study. These strains originate from patients, plants and the environment. All strains were deposited at the CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre (<http://www.cbs.knaw.nl>). Isolates were characterised by molecular typing. The reference isolate, *Fusarium solani* ATCC MYA3636, was included as a quality-control isolate for both the CLSI and E-test methods.

Antifungal agents

E-test (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France) gradient strips of amphotericin B and voriconazole were used. They were

stored at -20°C until the day on which the test was performed. The concentration gradient for each drug ranged from 0.004–32 $\mu\text{g/mL}$.

Amphotericin B (Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) powder and voriconazole (Pfizer, Groton, CT, USA) were provided by the manufacturers as assay powders. As described in the CLSI M38-A2 protocol [3], stock solutions were prepared in dimethyl sulphoxide and stored at -20°C . Further dilutions were made in RPMI-1640 medium to yield two times the final concentration (0.03–16 $\mu\text{g/mL}$) required for the test.

Inoculation preparation

Inocula suspensions were prepared, as described in the CLSI M38-A2 document, from 7-day-old cultures grown on potato dextrose agar slants at 35°C for 72 h and then at 25°C for 96 h. Suspensions of conidia were spectrophotometrically adjusted to optical densities ranging from 0.15 to 0.17 at 530 nm, to obtain 0.4×10^4 to 5×10^4 CFU/mL as the inocula. The final sizes of the stock-inocula suspensions were tested by quantitative colony counts on Sabouraud dextrose agar. The inocula for the conidial suspensions were diluted to 1/50 in NaCl for testing by the CLSI M38-A2 method.

CLSI broth microdilution method (M38-A2 document)

Each microplate well (final volume of 200 μL), containing 100 μL of the diluted drug concentration, was inoculated with 100 μL of the diluted inocula of conidial suspensions. Growth and sterility controls were included for each isolate tested. *Fusarium solani* ATCC MYA3636 was tested as a reference control at each day of testing. Microdilution plates were incubated at 35°C and examined 48 h later for minimal inhibitory concentration (MIC) determination. The MICs were determined by a visual read of complete growth inhibition. All isolates were tested in duplicate using this method of susceptibility testing.

The E-test procedure

The E-test was performed following the manufacturer's instructions. Each solidified RPMI medium (depth 4 mm; AES, Bruz, France) was inoculated by dipping a sterile swab into the respective undiluted inocula suspension and streaking this in three directions over the entire surface of the plate. The agar surface was dried for 15 min, and the strips were placed onto the inoculated agar. The plates were incubated at 35°C , and MICs were determined after an incubation of 48 h. The MICs determined by the E-test were the lowest drug concentrations at which the border of

the elliptical inhibition intercepted the scale on the antifungal strip. *Fusarium solani* ATCC MYA3636 was tested as a reference control on each day of testing.

Data analyses

The MICs and MIC ranges determined by the E-test and the CLSI M38-A2 method, the MIC₉₀ (cumulative MIC for 90% of isolates tested) and the corresponding GM (geometric mean) values were obtained for each drug tested (Table 1). In order to compare the two susceptibility methods, we determined the percentage agreement as described by Espinel-Ingroff et al. [4]. According to Espinel-Ingroff et al., because the E-test strips contained a continuous gradient instead of the established twofold drug-dilution schema, MICs determined by the E-test were elevated to the next twofold dilution concentration, which matched the drug dilution schema of the CLSI M38-A2 method [4]. This elevation of MICs in the E-test facilitated comparison and enabled presentation of results. As analysed previously [4], discrepancies between the MIC endpoints of no more than three dilutions were used to calculate the percentage agreement (Table 2).

Results and discussion

Among the population of 48 FSSC tested by the CLSI M38-A2 method, amphotericin B MICs (geometric means: 1.2 $\mu\text{g/mL}$) were lower than those of voriconazole (geometric means: 4.6 $\mu\text{g/mL}$; Table 1). CMI (geometric means) obtained on each day of testing for *Fusarium solani* ATCC MYA3636 was 1.7 $\mu\text{g/mL}$ for amphotericin B and 4.4 $\mu\text{g/mL}$ for voriconazole. Between each run and both methods, CMI differences were not higher than one dilution.

The proportion of FSSC considered resistant in vitro to the antifungals could not be determined because no interpretative susceptibility breakpoints have been formally proposed for *Fusarium* in the literature or by pharmaceutical laboratories. Thus, the data obtained were compared with previous studies on drug susceptibilities that used the CLSI method. For voriconazole, the geometric means and MIC ranges (1–16 $\mu\text{g/mL}$) were similar to those of other studies [5–8], and always had high values, i.e. ≥ 1 $\mu\text{g/mL}$, which is considered the epidemiological cut-off value for *Aspergillus fumigatus*. For amphotericin B, the range of MICs (0.125–2 $\mu\text{g/mL}$) was lower than that of other studies, where maximal MIC was 16 $\mu\text{g/mL}$ [6, 9]; however, Tortorano et al. [10] and other authors [11, 12] have reported very similar data to ours. For amphotericin B susceptibility testing, RPMI media was used as recommended by the

Table 1 MICs for 48 FSSCs determined by the E-test and the CLSI M38-A2 method

	MIC ($\mu\text{g}/\text{mL}$)					
	Amphotericin B			Voriconazole		
	GM	Range	MIC ₉₀	GM	Range	MIC 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

FSSC, *Fusarium solani* species complex; MIC, minimal inhibitory concentration; GM, geometric mean; MIC₉₀, cumulative MIC for 90% of isolates tested

CLSI, although this method has been demonstrated by others to present a reduced sensitivity for the detection of resistant strains. However, CMI differences between RPMI and AM3 are limited for FSSC as opposed to *Aspergillus* species [5].

For the FSSC population studied, the E-test MICs were more dispersed with larger MIC ranges compared with the CLSI M38-A2 microdilution method: geometric means (ranges) were 1.9 (0.064–32) and 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (0.25–32) for amphotericin B and voriconazole respectively. Compared with the CLSI reference method, the E-test over-estimated amphotericin B MICs and underestimated voriconazole MICs.

This study compared two methods of susceptibility testing. CLSI M38-A2 microdilution is the gold standard method whereas the E-test is a frequently used technique in clinical practice.

In our study, the number of dilutions between MICs obtained by the E-test and CLSI M38-A2 was determined for each strain, and the percentage agreement was calculated for the population studied. For amphotericin B, this value corresponded to 73%, whereas it was higher for voriconazole, at 92%. To our knowledge, ours is the first assay to test voriconazole using the E-test for a population of FSSC. For amphotericin B, agreement between CLSI and the E-test has been calculated at 40% [4] and at 80% [13]; however, discrepancies between the MIC endpoints were evaluated with two dilutions instead of three for the latter study [13]. Agreement between the CLSI and E-test has been evaluated for other moulds, and it is lower for FSSC than for *Aspergillus* species [4, 13].

According to these data, the question is raised whether the E-test is of value in assessing susceptibility in clinical laboratories. For example, a clinical isolate from our population gave an MIC value of 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ by the CLSI M38-A2 method and a MIC value of 12 $\mu\text{g}/\text{mL}$ with E-test for amphotericin B. With the reference method, the mycologist would have considered this antifungal to be active, whereas an opposite interpretation would have been made with the E-test. In addition to the pharmacokinetic characteristics of the drug in humans, which value is the most predictive of in vivo activity of amphotericin B and for clinical outcome?

According to our results, amphotericin B was the most active drug against FSSC. These observations are consistent with the favourable outcome observed for some patients treated with lipid-based amphotericin B [14]. Voriconazole seems to be less active in vitro, although a recent study has shown efficacy in antifungal treatment for fusariosis [15].

This study shows the difficulties in correlating in vitro susceptibility-testing methods, especially for FSSC compared with other moulds, such as *Aspergillus* spp. Correlations between the in vitro susceptibility data and clinical trials, or outcomes from case reports, are even more difficult to establish. Indeed, several factors are involved, such as the number of patients treated, the role of immune reconstitution and delays in initiating antifungal treatment. For this reason, animal models for invasive fusariosis could be an interesting intermediary between in vitro data and the predictive clinical outcomes for patients.

Table 2 Distribution of differences in MICs and percentage agreement between the E-test and the CLSI M38-A2 method

	Number of isolates for which MICs determined by E-test differed from MICs determined by the CLSI M38-A2 method following dilution							% agreement
	>+2	+ 2	+ 1	0	- 1	- 2	< - 2	
Amphotericin B	13	8	13	9	4	1	0	73
Voriconazole	1	0	3	9	18	14	3	92

Acknowledgements We thank Pfizer for the voriconazole powder assay and for checking the English.

References

- Nucci M, Anaissie E (2007) *Fusarium* infections in immunocompromised patients. *Clin Microbiol Rev* 20(4):695–704
- Cuenca-Estrella M, Gomez-Lopez A, Mellado E, Buitrago MJ, Araceli M, Rodriguez-Tudela JL (2006) Head-to-Head comparison of the activities of currently available antifungal agents against 3,378 Spanish clinical isolates of yeast and filamentous fungi. *Antimicrob Agents Chemother* 50(3):917–921
- Clinical and Laboratory Standards Institute (2008) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved Standard, 2nd edn. CLSI, Wayne
- Espinel-Ingroff A (2001) Comparison of the E-test with the NCCLS M38-P method for antifungal susceptibility testing of common and emerging pathogenic filamentous fungi. *J Clin Microbiol* 39(4):1360–1367
- Arikan S, Lozano-Chiu M, Paetznick V, Nangia S, Rex JH (1999) Microdilution susceptibility testing of amphotericin B, itraconazole, and voriconazole against clinical isolates of *Aspergillus* and *Fusarium* species. *J Clin Microbiol* 37(12):3946–3951
- Paphitou N, Ostrosky-Zeichner L, Paetznick V, Rodriguez JR, Chen E, Rex JH (2002) In vitro activities of investigational triazoles against *Fusarium* species: effects of inoculum size and incubation time on broth microdilution susceptibility test results. *Antimicrob Agents Chemother* 46(10):3298–3300
- Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzon A, Mellado E, Rodriguez-Tudela JL (2008) Antifungal susceptibility profile of clinical *Fusarium* spp. isolates identified by molecular methods. *J Antimicrob Chemother* 61:805–809
- Espinel-Ingroff A, Johnson E, Hockey H, Troke P (2008) 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* 61:616–620
- Cordoba S, Rodero L, Vivot W, Abrantes R, Davel G, Vitale RG (2008) In vitro interactions of antifungal agents against clinical isolates of *Fusarium* spp. *Intl J Antimicrob Agents* 31:171–174
- Tortorano A, Prigitano A, Dho G, Esposto MC, Gianni C, Grancini A, Ossi C, Viviani MA (2008) Species distribution and in vitro antifungal susceptibility patterns of 75 clinical isolates of *Fusarium* spp. from northern Italy. *Antimicrob Agents Chemother* 52(7):2683–2685
- Iqbal NJ, Boey A, Park BJ, Brandt ME (2008) Determination of in vivo susceptibility of ocular *Fusarium* spp. isolates from keratitis cases and comparison of Clinical and Laboratory Standards Institute M38-A2 and E test methods. *Diagn Microbiol Infect Dis* 62:348–350
- Xie L, Zhai H, Zhao J, Sun S, Shi W, Dong X (2008) Antifungal susceptibility for common pathogens of fungal keratitis in Shandong Province, China. *Am J Ophthalmol* 146(2):260–265
- Szekely A, Johnson E, Wamock D (1999) Comparison of E-test and broth microdilution methods for antifungal drug susceptibility testing of molds. *J Clin Microbiol* 37(5):1480–1483
- Campo M, Lewis R, Kontoyiannis D (2010) Invasive fusariosis in patients with hematologic malignancies at a cancer center: 1998–2009. *J Infect* 60:331–337
- Lortholary O, Obenga G, Biswas P (2010) International retrospective analysis of 73 cases of invasive fusariosis treated with voriconazole. *Antimicrob Agents Chemother* 54(10):4446–4450

Overinduction of the *CYP51A* Gene After Exposure to Azole Antifungals Provides a First Clue to the Resistance Mechanism in the *Fusarium solani* Species Complex

Maurine D'Agostino,¹ Thomas Lemmet,¹ Claire Dufay,¹ Amandine Luc,²
Jean Pol Fripiat,¹ Marie Machouart,^{1,3} and Anne Debourgogne^{1,3}

The genus *Fusarium* is largely represented in fungal infections, not only mostly in plants but also in humans. Fungi belonging to the *Fusarium solani* species complex (*FSSC*) are those that are most frequently isolated in invasive fusariosis and present elevated minimum inhibitory concentrations for the main antifungal drugs used in medicine. This study is the first to investigate the resistance mechanism in *FSSC* by monitoring *CYP51A* expression in the presence of azole antifungals. After exposure to voriconazole, an overinduction of *CYP51A* was observed irrespective of the concentration of antifungal used and the generation studied. The same observation is made for other azole antifungals, posaconazole and tebuconazole, but not for amphotericin B. This observation could contribute to explaining why some antifungal molecules used in agriculture or medical practices may have low susceptibility for some fungi.

Keywords: *Fusarium solani* species complex (*FSSC*), antifungal resistance, voriconazole, *CYP51*, over-induction

Introduction

OPPORTUNISTIC INVASIVE FUSARIOSES are severe fungal infections, refractory to treatment, and present a high mortality rate.¹ Recent guidelines have recommended voriconazole as the first-line therapy against these mycoses, in association with surgical debridement.²

However, clinical strains of the *Fusarium solani* species complex (*FSSC*) usually show high *in vitro* minimum inhibitory concentrations (MICs) for antifungal drugs and are also characterized by frequent *in vivo* resistance.³ Voriconazole has a mean MIC of 4.6 µg/mL and an epidemiological cutoff value (ECV) of 32 µg/mL.^{4,5} Unfortunately, clinical response to therapy cannot be predicted using ECVs that differ from breakpoints.⁵ A better understanding of the molecular mechanisms of resistance is therefore needed.

Azole molecules, such as voriconazole, target the 14 alpha-demethylase enzyme, block it, and inhibit the synthesis of cellular ergosterol. This protein is encoded by the *ERG11* and *CYP51* genes in yeasts and fungi, respectively. Resistance to azoles can be mediated by different mechanisms. Among them,

the best known is a mutation of the target gene, leading to a change in protein conformation and consequently to a decrease in the affinity between azoles and the target enzyme, as described for *Saccharomyces cerevisiae* with crystallography.⁶ This phenomenon has been identified for the *CYP51A* gene in *Aspergillus fumigatus* strains that are resistant to azole antifungals.⁷ Other mechanisms may also be involved, however, such as target gene upregulation.⁸ In *Candida albicans*, mutations in the transcription factor *UPC2* induce overexpression of *ERG11* and confer azole resistance.⁹

In the genus *Fusarium*, three paralogous *CYP51* genes have been described and designated as *CYP51A*, *CYP51B*, and *CYP51C*.¹⁰ The function of these genes has been investigated in *Fusarium graminearum* and *CYP51A* was shown to be responsible for the intrinsic variation in azole sensitivity.¹¹ On the contrary, *CYP51B* and *CYP51C* have not been described to play an essential role in antifungal activity.¹¹

To date, the mechanism involved in *FSSC* strains' low sensitivity to azoles is still unclear. The aim of this study was to explore *CYP51A* expression in *FSSC* cultures incubated with different azole antifungals to constitute a

¹Laboratoire Stress Immunité Pathogènes, EA7300, Faculté de Médecine, Vandœuvre-les-Nancy, France.

²Unité de Méthodologie, Data Management et Statistique, PARC, CHRU de Nancy, Hôpitaux de Brabois, Vandœuvre-les-Nancy, France.

³Service de Parasitologie-Mycologie, CHRU de Nancy, Hôpitaux de Brabois, Vandœuvre-les-Nancy, France.

TABLE 1 CHARACTERISTICS OF THE *FUSARIUM SOLANI* SPECIES COMPLEX STRAINS USED IN THIS STUDY

Collection number	MIC voriconazole ($\mu\text{g/mL}$)		Genotype	Origin	
	CLSI	E-test		Location	Geography
CBS 115660	2	0.5	21 d	Potatoes	Egypt
CBS 124630	2	1	3+4 bbbb	Skin	France
CBS 124899	4	2	2 d	Nail	Gabon
CBS 124896	4	4	11 i	Blood	Belgium
CBS 124895	8	8	5 o	Skin	France
CBS 118931	4	32	9 a	Tomatoes	United Kingdom
CBS 124889	0.5	12	2 d	Nail	France
CBS 224.34	1	2	1 b	Toe nail	Cuba
CBS 102824	0.5	0.75	25 d	Plated litter fragment	Colombia
CBS 117608	1	0.38	6 f	Arm lesion dermis	Turkey

MIC, minimum inhibitory concentration.

first approach toward exploration of the mechanism of acquired resistance.

Materials and Methods

Isolates

Ten FSSC isolates were used for this study, among which different strains were selected depending on different experiments. These strains, previously studied, present different genotypes and MICs determined by both the CLSI and E-test methods.⁴ For all strains, the corresponding CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre collection numbers and characteristics are listed in Table 1. Strains were stored at -20°C in water/glycerol (1/1).

Cultivation

Fusarium strains were grown on yeast extract sucrose medium and incubated at 30°C with stirring at 180 rpm for half a week.¹² The medium was supplemented with various concentrations of antifungals: $\frac{1}{4}$ or $\frac{1}{2}$ of the previously determined MIC for each selected strain for each of the following molecules: voriconazole (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), posaconazole (Sigma-Aldrich), tebuconazole (Sigma-Aldrich), and amphotericin B (Sigma-Aldrich). A culture without any antifungal was used as a control. For this study, culture generation is defined as about 80 hours of growth.

RNA extraction

RNA was extracted from liquid cultures using the RNeasy[®] Plant Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) after filtration through Miracloth paper (Merck Millipore, Fontenay sous Bois, France) and mycelium washings with sterile water.

The RNA concentration was determined using a Nanodrop 2000 system (Thermo Scientific, Wilmington).

Primer and probe design

To ensure the specificity of our quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR) experiments, the forward primer was designed over the junction, obtained after pre-mRNA splicing, between two different exons (Fig. 1). Sequences of primers and probes are shown in Table 2. Specificity of the *CYP51A* primers was verified against *CYP51B* and *C* genes by bioinformatics and sequencing.

Multiplex RT-qPCR

To quantify *CYP51A* expression, a multiplex RT-qPCR was developed using *GAPDH* (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase) mRNA as the reference. RT-qPCR multiplex assays were carried out in triplicate using the QuantiTect Multiplex RT-PCR NR Kit (Qiagen) in 25- μL reaction volumes containing 5 μL of RNA 10 $\mu\text{mol/L}$. Experiments were run in an iCycler MyIQ2 Thermal cycler (Biorad, France). To optimize multiplex PCR and reduce competition between the target and reference transcripts, various tests were applied according to suppliers' recommendations. Optimal conditions were obtained by mixing 12.5 μL of Master Mix, 2 μL of MgCl_2 (25 mmol/L), 4 μL of RNase-free water, 0.25 μL of reverse transcriptase mix, 0.25 μL of each *GAPDH* primer (20 $\mu\text{mol/L}$), 0.125 μL of *GAPDH* probe (20 $\mu\text{mol/L}$), 0.25 μL of each *CYP51A* primer (40 $\mu\text{mol/L}$), and 0.125 μL of *CYP51A* probe (40 $\mu\text{mol/L}$). This mix was subjected to an initial 20-minute reverse transcription step at 50°C , followed by an activation step at 95°C for 15 minutes, and then 45 PCR cycles at 94°C for 45 seconds and 60°C for 45 seconds with fluorescence acquisition.

FIG. 1. Location of primers (**bold and underlined**) and probe (*gray*) used to perform RT-qPCR experiments. Intron is shown in *italics*. RT-qPCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

CTCTCATCTTCCACTGGCTTCCCTTCATCGGCAATGCTGTGTCGTAT
GGCCTAGATCCGTGTAACCTTCTTCATGAAGTG**TCCGAGAGAAG***gtaga*
gtaccaactctagcacactgcaattcttcgctgactgtttgggtccgta
*tcttcttttag***CACGGCG***ACGTCTTCACCTTTGTCTCTTTGGCCGA*
AGATTGCTGCTGTCTCGGAGT*CGAAGGCAACGACTTTGTCTCTCAAC*
AGCCGA*CTCCAAGACGCCAACGCCGAAGAGATCTACGGTCCCCTCAC*
GATCCCCGTCTTCGGTAGCGATGTCGTA

TABLE 2. SEQUENCES OF PRIMERS AND PROBES USED FOR MULTIPLEX RT-qPCR (*GAPDH*: REFERENCE mRNA; *CYP51A*: TARGET mRNA)

Name	Sequence
GAPDH F	5'-CTCAAGGGCGTTCTCGCTTA-3'
GAPDH R	5'-CACTCGTTGTCGTACCAGGA-3'
GAPDH S	5'-FAM-CACCAACTCCTCCATCTTC GATG-TAMRA-3'
CYP51A F	5'-TCGAGAGAAGCACGGC-3'
CYP51A R	5'-TCGGCTGTTGAGGACAA-3'
CYP51A S	5'-HEX-CGACTCCGAGACAGCAGACA ATCTTTG-BHQ-3'

RT-qPCR, quantitative reverse transcription polymerase chain reaction.

Data analyses

The Livak method was chosen to normalize expression ratios in strains grown in the presence of antifungals by comparison with control cultures because both target and reference transcripts were amplified with efficiencies near 100% and within 5% of each other.¹³

Statistical analyses

The Friedman test (nonparametric statistical test) in paired samples was used to compare expression ratios of *CYP51A* in the presence of antifungals in each generation. Because of the multiplicity of tests, the alpha risk was 1.6% for all analyses. These statistical analyses were performed using SAS 9.4 software (SAS Institute).

Results

Constitutive *CYP51A* expression

Constitutive expression of *CYP51A* was observed for all *F. solani* strains cultivated without antifungals. Moreover,

even if the relative quantification of *CYP51A* was different depending on the strains, no association could be made between *CYP51A* expression levels and MIC values ($r^2=0.05$).

CYP51A expression after exposure to voriconazole

Nine strains (isolates described in Table 1, except CBS 124896) were cultured with different concentrations of voriconazole over 1, 2, or 3 generations. All demonstrated overexpression of the *CYP51A* gene, with a ratio ranging from 3 to 2,165. For each experimental condition in the presence of voriconazole, the mean ratios shown in Fig. 2 are significantly different from 1; the control ratio was obtained from strains grown in culture medium without voriconazole (Table 3). Both concentrations tested induced overexpression even if the *CYP51A* expression is independent of the voriconazole dose ($p=0.045$ for a voriconazole concentration at 1/2 MIC and $p=0.236$ for a voriconazole concentration at 1/4 MIC). Moreover, no significant differences were observed between the three generations ($p=1.000$, $p=0.470$, and $p=0.631$ for generations 1, 2, and 3, respectively). In control conditions, without antifungals, no modification of the expression is observed over time and generations. Thus, after exposure to voriconazole, an overinduction of *CYP51A* was observed irrespective of the concentration of antifungal used and the generation studied.

CYP51A expression after exposure to azole antifungals

Four isolates (CBS 124899, CBS 118931, CBS 124896, and CBS 124629) were cultivated with other antifungals (posaconazole, tebuconazole, or amphotericin B) using the same protocol as above. After exposure to posaconazole and tebuconazole, overinduction was observed with p -values <0.0001 and 0.006 , respectively, but not after amphotericin B exposure (Table 4 and Fig. 3).

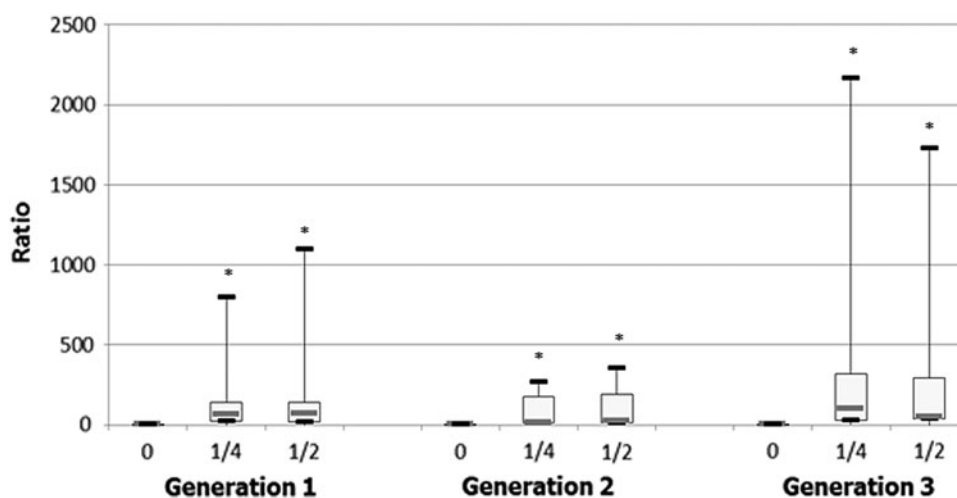


FIG. 2. *CYP51A* expression in the presence of voriconazole (* $p < 0.016$). For each generation cultivated in the presence of one-quarter or one-half the voriconazole MIC, the relative expression of *CYP51A* was determined by RT-qPCR. The signals obtained were expressed relative to corresponding controls (set to 1) grown without voriconazole. Strains used were CBS 115660, CBS 124630, CBS 124899, CBS 124895, CBS 118931, CBS 124889, CBS 224.34, CBS 102824, and CBS 117608. The comparison is statistically significant according to the Friedman test if p -value <0.016 . MIC, minimum inhibitory concentration.

TABLE 3. COMPARISON OF THE EXPRESSION RATIOS OF *CYP51A* IN THE PRESENCE OF VORICONAZOLE

		VRZ = 0		VRZ = ¼		VRZ = ½		p
		n	Ratio mean	n	Ratio mean	n	Ratio mean	
G 1	VRZ = 0 vs. ¼	9	1	9	97.0	8	94.9	0.0001
	VRZ = 0 vs. ½	9	1					0.0002
G 2	VRZ = 0 vs. ¼	9	1	9	87.9	8	138.5	0.0001
	VRZ = 0 vs. ½	9	1					0.0002
G 3	VRZ = 0 vs. ¼	7	1	6	569.3	6	439.7	0.0011
	VRZ = 0 vs. ½	7	1					0.0011

For each generation cultivated in the presence of one-quarter or one-half the voriconazole MIC, the relative expression of *CYP51A* was determined by RT-qPCR. The signals obtained were expressed relative to corresponding controls (set to 1) grown without voriconazole. Strains used were CBS 115660, CBS 124630, CBS 124899, CBS 124895, CBS 118931, CBS 124889, CBS 224.34, CBS 102824, and CBS 117608. The comparison is statistically significant according to the Friedman test if *p*-value <0.016.

G, generation; VRZ, voriconazole.

Discussion

Different mechanisms of resistance to antifungal agents have been described, such as the lack of molecule import into the cell, lack of activation in the case of a prodrug, overproduction of the antifungal target, modification or disappearance of the target, metabolic derivation, or active efflux.¹⁴ In the *Candida* genus, most of these mechanisms are involved in azole resistance: upregulation of drug transporters, numerous point mutations in *ERG11*, overexpression of *ERG11*, and loss of function of *ERG3*.^{14,15}

Resistance to azole antifungals in *A. fumigatus* is a major and increasing problem in many countries.^{7,16–18} *A. fumigatus* isolates may be resistant to a single azole such as itraconazole or more rarely voriconazole, two azoles such as itraconazole and posaconazole, or multiazole resistant.¹⁶ The major resistance mechanism in clinical isolates is a substitution of leucine for histidine at position 98 associated with the presence of multiple copies of a 34-base pair sequence repeated in tandem in the promoter of the *CYP51* gene, designated TR₃₄/L98H.⁷ The origin of this azole resistance is double. On the one hand, an environmental source is suggested and explained by agricultural use of triazole fungicides that are highly similar to the antifungal triazoles used in medicine.^{19–21} On the other hand, a secondary acquisition of resistance can be observed associated with minority resistant populations harboring mutations in *CYP51A*, mainly in patients receiving long-term azoles.²²

FSSC is a fungal complex with high MICs for major antifungal agents. The results of this study show that cultivation

in the presence of subinhibitory doses of voriconazole induces an overexpression of *CYP51A*. A positive trend of this expression seems to be observed over the generations, although it is not significant. Other data are therefore necessary to support the hypothesis of an acquired resistance mechanism following exposure to antifungal molecules. An adaptation to the drug environment may also be hypothesized as similar global upregulation mechanisms implying *ERG* genes have already been described in several *Candida* species in response to azoles or other sterol biosynthesis inhibitors.²³ This overexpression is also observed with other molecules of the azole class such as posaconazole, used in clinical practice, or tebuconazole, used in agriculture. On the other hand, we noted that no modification of *CYP51A* expression is induced by amphotericin B, which presents another mechanism of action. Polyene causes the formation of concentration-dependant channels that kill cells by allowing ions and other cellular components to escape.¹⁴

Because of the ecological and clinical characteristics of fusariosis, these observations may contribute to explaining the lower susceptibility to antifungal agents. Azole compounds, such as voriconazole or posaconazole, are used in prophylactic or pre-emptive treatments in immunocompromised patients at risk for invasive fungal infections. Recently, the primary cutaneous portal of entry has been considered as a reservoir for invasive fusariosis.²⁴ Consequently, isolates hosted by patients could develop resistance in response to the selection pressure generated by administration of various antifungals.

TABLE 4. COMPARISON OF THE EXPRESSION RATIOS OF *CYP51A* IN THE PRESENCE OF OTHER MOLECULES (POSACONAZOLE, TEBUCONAZOLE, AND AMPHOTERICIN B)

		n	Ratio mean	P
Posaconazole	Control	12	1	<0.0001
	Culture with molecule	20	118.4	
Tebuconazole	Control	4	1	0.006
	Culture with molecule	8	138.1	
Amphotericin B	Control	10	1	0.023
	Culture with molecule	20	1.25	

Relative expression of *CYP51A* determined by RT-qPCR after culture of strains CBS 124899, CBS 118931, CBS 124896, and CBS 124629 in the presence of posaconazole, tebuconazole, or amphotericin B (1/2 MIC). The signals obtained were expressed relative to corresponding controls (set to 1) grown without antifungals. The comparison is statistically significant according to the Friedman test if *p*-value <0.016.

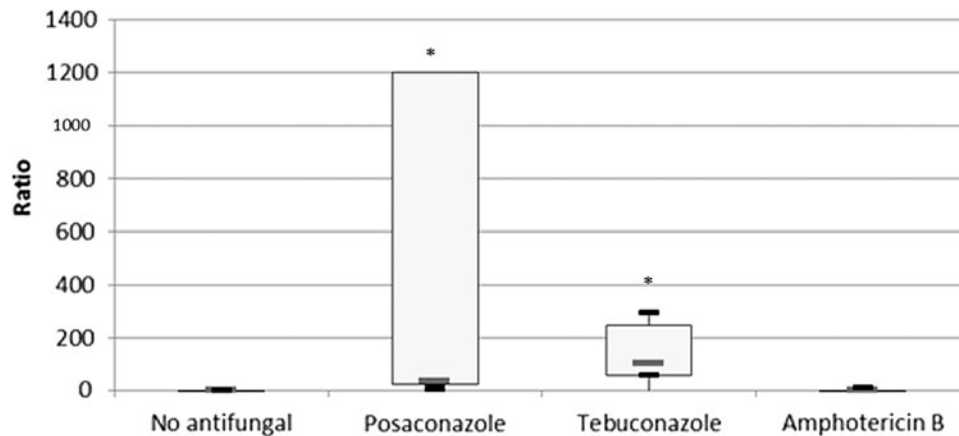


FIG. 3. *CYP51A* expression in the presence of other antifungal agents (* $p < 0.016$). Relative expression of *CYP51A* determined by RT-qPCR after culture of strains CBS 124899, CBS 118931, CBS 124896, and CBS 124629 in the presence of posaconazole, tebuconazole, or amphotericin B (1/2 MIC). The signals obtained were expressed relative to corresponding controls (set to 1) grown without antifungals. The comparison is statistically significant according to the Friedman test if p -value < 0.016 .

On the agricultural side, *Fusarium* is considered as one of the main phytopathogenic genera, and the overexpression of *CYP51A* in *F. graminearum* in the presence of tebuconazole has already been described.^{10,25}

Together, these observations highlight the risk of the emergence of antifungal-resistant species due to environmental pressures.

To conclude, in this work, an overexpression of *CYP* genes has been shown in the presence of azole antifungals. Being observed over several generations, this mechanism could be involved in the decreased sensitivity of the *Fusarium* genus to antifungals. However, additional data, especially phenotypic (MIC), are still needed to definitively prove this hypothesis.

Acknowledgments

The authors express their gratitude to Anne-Marie Carpentier and Lisiane Cunat for their efficient technical support.

Disclosure Statement

No competing financial interests exist.

References

- Guarro, J. 2013. Fusariosis, a complex infection caused by a high diversity of fungal species refractory to treatment. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 32:1491–1500.
- Tortorano, A.M., M. Richardson, E. Roilides, A. van Diepeningen, M. Caira, P. Munoz, E. Johnson, J. Meletiadis, Z.D. Pana, M. Lackner, P. Verweij, T. Freiburger, O.A. Cornely, S. Arikan-Akdagli, E. Dannaoui, A.H. Groll, K. Lagrou, A. Chakrabarti, F. Lanternier, L. Pagano, A. Skiada, M. Akova, M.C. Arendrup, T. Boekhout, A. Chowdhary, M. Cuencá-Estrella, J. Guinea, J. Guarro, S. de Hoog, W. Hope, S. Kathuria, O. Lortholary, J.F. Meis, A.J. Ullmann, G. Petrikos, and C. Lass-Flörl; European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases Fungal Infection Study Group and European Confederation of Medical Mycology. 2014. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin. Microbiol. Infect.* 20 Suppl 3:27–46.
- Azor, M., J. Gene, J. Cano, and J. Guarro. 2007. Universal in vitro antifungal resistance of genetic clades of the *Fusarium solani* species complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* 51:1500–1503.
- Debourgogne, A., S. de Hoog, A. Lozniewski, and M. Machouart. 2012. 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.* 31:615–618.
- Espinel-Ingroff, A., A.L. Colombo, S. Cordoba, P.J. Dufresne, J. Fuller, M. Ghannoum, G.M. Gonzalez, J. Guarro, S.E. Kidd, J.F. Meis, T.M. Melhem, T. Pelaez, M.A. Pfaller, M.W. Szesz, J.P. Takahaschi, A.M. Tortorano, N.P. Wiederhold, and J. Turnidge. 2016. International evaluation of MIC distributions and epidemiological cutoff value (ECV) definitions for *Fusarium* species identified by molecular methods for the CLSI broth microdilution method. *Antimicrob. Agents Chemother.* 60:1079–1084.
- Monk, B.C., T.M. Tomasiak, M.V. Keniya, F.U. Huschmann, J.D.A. Tyndall, J.D. O'Connell, R.D. Cannon, J.G. McDonald, A. Rodriguez, J.S. Finer-Moore, and R.M. Stroud. 2014. Architecture of a single membrane spanning cytochrome P450 suggests constraints that orient the catalytic domain relative to a bilayer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:3865–3870.
- Snelders, E., H.A.L. van der Lee, J. Kuijpers, A.J.M.M. Rijs, J. Varga, R.A. Samson, E. Mellado, A.R. Donders, W.J. Melchers, and P.E. Verweij. 2008. Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med.* 5:e219.
- Cowen, L.E., and W.J. Steinbach. 2008. Stress, drugs, and evolution: the role of cellular signaling in fungal drug resistance. *Eukaryot. Cell* 7:747–764.
- Flowers, S.A., K.S. Barker, E.L. Berkow, G. Toner, S.G. Chadwick, S.E. Gyax, J. Morschhäuser, and P.D. Rogers. 2012. Gain-of-function mutations in *UPC2* are a frequent cause of *ERG11* upregulation in azole-resistant clinical isolates of *Candida albicans*. *Eukaryot. Cell* 11:1289–1299.

10. Becher, R., F. Weihmann, H.B. Deising, and S.G. Wirsal. 2011. Development of a novel multiplex DNA microarray for *Fusarium graminearum* and analysis of azole fungicide responses. *BMC Genomics* 12:52.
11. Fan, J., M. Urban, J.E. Parker, H.C. Brewer, S.L. Kelly, K.E. Hammond-Kosack, B.A. Fraaije, X. Liu, and H.J. Cools. 2013. Characterization of the sterol 14 α -demethylases of *Fusarium graminearum* identifies a novel genus-specific CYP51 function. *New Phytol.* 198:821–835.
12. Droce, A., J.L. Sørensen, H. Giese, and T.E. Sondergaard. 2013. Glass bead cultivation of fungi: combining the best of liquid and agar media. *J. Microbiol. Methods* 94:343–346.
13. Livak, K.J., and T.D. Schmittgen. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods San Diego Calif.* 25:402–408.
14. Perlin, D.S., R. Rautemaa-Richardson, and A. Alastruey-Izquierdo. 2017. The global problem of antifungal resistance: prevalence, mechanisms, and management. *Lancet Infect. Dis.* 17:e383–e392.
15. Arendrup, M.C., and T.F. Patterson. 2017. Multidrug-resistant *Candida*: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J. Infect. Dis.* 216:S445–S451.
16. Bueid, A., S.J. Howard, C.B. Moore, M.D. Richardson, E. Harrison, P. Bowyer, and D.W. Denning. 2010. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *J. Antimicrob. Chemother.* 65:2116–2118.
17. Morio, F., G.G. Aubin, I. Danner-Boucher, A. Haloun, E. Sacchetto, D. Garcia-Hermoso, S. Bretagne, M. Miegville, and P. Le Pape. 2012. High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *J. Antimicrob. Chemother.* 67:1870–1873.
18. Chowdhary, A., C. Sharma, and J.F. Meis. 2017. Azole-resistant Aspergillosis: epidemiology, molecular mechanisms, and treatment. *J. Infect. Dis.* 216:S436–S444.
19. Snelders, E., S.M.T. Camps, A. Karawajczyk, G. Schafteenaar, G.H.J. Kema, H.A. van der Lee, C.H. Klaassen, W.J. Melchers, and P.E. Verweij. 2012. Triazole fungicides can induce cross-resistance to medical triazoles in *Aspergillus fumigatus*. *PLoS One* 7:e31801.
20. Chowdhary, A., S. Kathuria, J. Xu, and J.F. Meis. 2013. Emergence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains due to agricultural azole use creates an increasing threat to human health. *PLoS Pathog.* 9:e1003633.
21. Faria-Ramos, I., S. Farinha, J. Neves-Maia, P.R. Tavares, I.M. Miranda, L.M. Estevinho, C. Pina-Vaz, and A.G. Rodrigues. 2014. Development of cross-resistance by *Aspergillus fumigatus* to clinical azoles following exposure to prochloraz, an agricultural azole. *BMC Microbiol.* 14:155.
22. Camps, S.M.T., A.J.M.M. Rijs, C.H.W. Klaassen, J.F. Meis, C.M. O’Gorman, P.S. Dyer, W.J. Melchers, and P.E. Verweij. 2012. Molecular epidemiology of *Aspergillus fumigatus* isolates harboring the TR34/L98H azole resistance mechanism. *J. Clin. Microbiol.* 50:2674–2680.
23. Henry, K.W., J.T. Nickels, and T.D. Edlind. 2000. Upregulation of ERG genes in *Candida* species by azoles and other sterol biosynthesis inhibitors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 44:2693–2700.
24. Nucci, M., A.G. Varon, M. Garnica, T. Akiti, G. Barreiros, B.M. Trope, and S.A. Nouer. 2013. Increased incidence of invasive fusariosis with cutaneous portal of entry, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 19:1567–1572.
25. Dean, R., J.A.L. Van Kan, Z.A. Pretorius, K.E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P.D. Spanu, J.J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis, and G.D. Foster. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 13:414–430.

Address correspondence to:

Anne Debourgogne
 Service de Parasitologie-Mycologie
 Hôpitaux de Brabois
 CHRU de Nancy
 11 allée du Morvan
 Vandœuvre-les-Nancy 54511
 France

E-mail: a.debourgogne@chru-nancy.fr



FUSARIUM SOLANI, TYPAGE MOLECULAIRE ET MECANISMES D'ADAPTATION A SON ENVIRONNEMENT

Anne DEBOURGOGNE

Fusarium est un champignon trans règne, il est à la fois connu comme phytopathogènes mais aussi impliqué dans des infections fongiques chez les mammifères dont l'Homme.

Après avoir décrit deux schémas de typage moléculaire de *Fusarium solani*, illustrés lors de cas groupés de fusarioses chez des requins, il a été montré que ce complexe d'espèces présentait une sensibilité faible au voriconazole et à l'amphotéricine, les molécules antifongiques recommandées en pathologie clinique.

Fusarium solani s'adapte à son environnement. D'une part, en présence de pression antifongique d'origine médicale et agricole, le champignon devient plus résistant au voriconazole et le gène *CYP51A* est surexprimé. D'autre part, le phytopathogène s'adapte aux conditions physiques de gravité, en condition de microgravité, la synthèse de biofilm décroît.

Ces mécanismes d'adaptation à l'environnement et à ces stress seront plus largement étudiés au niveau fondamental via une étude des mécanismes de résistance aux antifongiques mis en jeu mais aussi sur les modifications physiologiques réactionnelles à la culture en microgravité.

En complément, une étude clinique multicentrique sur les fusarioses invasives et les kératites sera réalisée afin de déterminer des marqueurs d'infection et de résistance.

Fusarium is a trans kingdom fungus, it is both known as a phytopathogen but also involved in fungal infections in mammals including humans.

After describing two molecular typing schemes for *Fusarium solani*, illustrated in grouped cases of fusariosis in sharks, this species complex was shown to have low sensitivity to voriconazole and amphotericin, the antifungal molecules recommended in clinical pathology.

Fusarium solani adapts to its environment. On the one hand, under the presence of antifungal pressure of medical and agricultural origin, the fungus becomes more resistant to voriconazole and the *CYP51A* gene is overexpressed. On the other hand, the phytopathogen adapts to the physical conditions of gravity, under microgravity conditions, biofilm synthesis decreases.

These mechanisms of adaptation to the environment and to these stresses will be more widely studied at the fundamental level via a study of the mechanisms of resistance to the antifungals involved but also on the physiological modifications reactive to culture in microgravity.

In addition, a multicenter clinical study on invasive fusarioses and keratitis will be carried out in order to determine markers of infection and resistance.