



**HAL**  
open science

# Etude des mécanismes de résistance aux azolés chez le complexe d'espèce *Fusarium solani*

Pierre Vermeulen

► **To cite this version:**

Pierre Vermeulen. Etude des mécanismes de résistance aux azolés chez le complexe d'espèce *Fusarium solani*. Microbiologie et Parasitologie. Université de Lorraine, 2023. Français. NNT : 2023LORR0391 . tel-04727201

**HAL Id: tel-04727201**

**<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-04727201v1>**

Submitted on 9 Oct 2024

**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**

**BIBLIOTHÈQUES  
UNIVERSITAIRES**

## AVERTISSEMENT

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

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

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

Contact bibliothèque : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)  
*(Cette adresse ne permet pas de contacter les auteurs)*

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

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

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

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

**Thèse**

**Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de**

**DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE LORRAINE**

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

**par Pierre VERMEULEN**

**Sous la direction du Professeure Anne DEBOURGOGNE**

**Étude des mécanismes de résistance aux azolés  
chez le complexe d'espèces *Fusarium solani***

**14 décembre 2023**

**Membres du jury :**

<b>Directeurs de thèse :</b>	<b>Madame Anne DEBOURGOGNE</b>	Professeure, Université de Lorraine, Nancy
	<b>Madame Marie MACHOUART</b>	Professeure, Université de Lorraine, Nancy
<b>Rapporteurs :</b>	<b>Madame Estelle PERRAUD-CATEAU</b>	Professeure, Université de Poitiers, Poitiers
	<b>Monsieur Eric DANNAOUI</b>	Docteur, AP-HP.Centre-Université de Paris
<b>Examineurs:</b>	<b>Monsieur Frédéric DALLE</b>	Professeur, Université de Bourgogne, Dijon
<b>Président :</b>	<b>Monsieur Jean Pol FRIPPIAT</b>	Professeur, Université de Lorraine, Nancy



# REMERCIEMENTS

## **A Madame le Professeure Estelle PERRAUD-CATEAU**

Vous me faites l'honneur de juger ce travail. Merci de l'intérêt que vous porterez à ce travail. Veuillez trouver l'expression de mes sincères remerciements.

## **A Monsieur le Docteur Eric DANNAOUI**

Merci d'avoir accepté d'être rapporteur et d'avoir consacré une partie de votre temps à la lecture, l'analyse et la critique de ce travail. Veuillez accepter ma reconnaissance et mes remerciements les plus sincères.

## **A Monsieur le Professeur Frédéric DALLE**

Je suis honoré de vous compter dans le jury de cette thèse. Veuillez trouver ici l'expression de ma sincère gratitude pour l'intérêt que vous porterez à cette thèse.

## **A Monsieur le Professeur Jean-Pol FRIPPIAT**

Vous m'avez fait l'honneur de porter un jugement averti sur ce travail, mais également de m'avoir accueilli dans votre unité de recherche UR7300. Veuillez trouver ici l'expression de ma reconnaissance et de mon profond respect.

## **A Madame le Professeur Marie MACHOUART**

Merci pour ton aide et tes conseils précieux, qui ont su m'encourager et m'aider tout au long de ces années. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité, et tout ce que tu m'as appris au quotidien au laboratoire.

### **A Madame le Professeur Anne DEBOURGOGNE**

Merci de m'avoir témoigné ta confiance en acceptant d'encadrer ce travail. Ta patience, tes conseils et remarques avisés m'ont été très précieuses. Merci pour le soutien dont tu as fait preuve à mon égard, tu as su me motiver et stimuler intellectuellement pendant ces 3 années. Merci aussi pour ta disponibilité à toute épreuve et ta bienveillance (... même si quelques coups de fouet furent nécessaires et totalement légitimes). La voix passive n'a (presque) plus de secret pour moi.

### **A toute l'équipe UR7300 SIMPA (Stress Immunité et Pathogènes)**

Je remercie à nouveau le Professeur Jean-Pol Frippiat, directeur de l'équipe de recherche, pour son accueil. Merci à Anne-Lyse Babin pour son aide précieuse. Merci pour ta disponibilité et ta bonne humeur. Ce travail n'aurait pas pu être complet sans toi. Je tiens à remercier toute l'équipe de recherche pour leur gaieté et la bonne ambiance qui règne dans ces couloirs.

### **A Monsieur le Docteur Arnaud GRUEZ (IMoPA - CNRS)**

Merci pour votre aide lors de la création du modèle tridimensionnel, vos conseils et votre expertise. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

### **A toute l'équipe du service de Microbiologie du CHRU de Nancy**

J'ai beaucoup aimé travailler avec vous. Merci à l'équipe des biologistes des autres disciplines pour leur gentillesse et les bons moments passés ensemble. Merci à Cédric pour ton soutien, tu n'as peut-être pas réussi à me faire faire du vélo ou de l'escalade mais merci de n'avoir jamais lâché l'affaire. Merci au Dr Cottrel, Claire pour avoir été mon premier docteur junior, pour ta bonne humeur, ta gentillesse et les pauses thé. Je te souhaite à mon tour une belle aventure. Merci à l'équipe technique pour leur accueil chaleureux et leur bonne humeur. Petite pensée pour ceux de parasitologie-mycologie, les meilleurs en toute objectivité. Merci pour les blagues, les rires et la joie qui m'ont accompagné tous les jours pendant ce long processus. Je pense rester, pour certains, encore un petit temps le « Pierrounet » du labo.

### **A ma belle famille**

Merci pour votre soutien. Ces bulles hors du temps sur un week-end m'ont donné l'énergie et la motivation qui pouvaient me faire défaut en fin de semaine. Vous m'avez toujours accueilli le plus chaleureusement qui soit.

### **A mes parents**

Merci pour votre présence rassurante depuis toutes ces années, votre soutien sans faille, vos mots réconfortants, votre patience, vos encouragements, votre gentillesse. Si je suis arrivé jusqu'ici, c'est en grande partie grâce à vous. Et je dis bien en partie, car on le sait bien : « on est seul dans sa barque », mais naviguer à côté de personnes aussi extraordinaires que vous, fait que j'ai pu voyager loin, très loin. Je vous aime mes petits parents, mes « doudous ».

### **A Robin**

Toi qui est arrivé dans ma vie, un tourbillon de joie, de sourire et de bouclettes blondes, tu fais de moi le plus heureux des papas.

### **A Anne-Elisabeth**

Pour avoir croisé mon chemin, pour ta douceur et ta gentillesse, pour ton soutien inépuisable, pour tes mots doux, pour ta présence quand ça ne va pas, pour tout ce qui fait que ma vie est merveilleuse depuis que je te connais, pour avoir dit oui. Tu m'as supporté pendant les moments difficiles et accompagné pendant les meilleurs. Pour tout ça, je te remercie du plus profond de mon cœur.



# ABRÉVIATIONS

#

---

°C : Degré Celsius

## **A**

---

ABC : ATP binding cassette

ACC : Acétylcoenzyme A carboxylase

ADN : Acide désoxyribonucléique

AMB : Amphotéricine B

ARN : Acide ribonucléique

Asn : Asparagine

Asp : Acide aspartique

ATCC : American type culture collection

ATP: Adénosine Tri Phosphate

## **C**

---

CBS-KNAW : Fungal Biodiversity Center

CLSI : Clinical and Laboratory Standards Institute

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CYP : Cytochrome P450

## **D**

---

DMSO : Diméthyl Sulfoxyde

DO : Densité Optique

## **E**

---

ECIL : European Conference on Infections in Leukaemia

ECMM : European Confederation of Medical Mycology

EF1 alpha : Translation elongation factor 1 alpha

EF1- $\alpha$  : Elongation factor 1- $\alpha$

EORTC : European Organization for Research and Treatment of Cancer

ESCMID : European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases

EUCAST : EUropean Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing

---

**F**

---

F : Sens (forward)

FFSC : *Fusarium fujikuroi* Species Complex

FIESC : *Fusarium incarnatum equiseti* Species Complex

FOSC : *Fusarium oxysporum* Species Complex

FSAMSC : *Fusarium sambucinum* Species Complex

FSSC : *Fusarium solani* Species Complex

**G**

---

GADP : Glycéraldéhyde 3P déshydrogénase

Glu : Acide glutamique

Gly : Glycine

GPD : Glycéraldéhyde 3P déshydrogénase

**H**

---

HE : Hématéine éosine

His : Histidine

**I**

---

ICL : Isocitrate lyase

IFI : Infection Fongique Invasive

Ile : Isoleucine

ITS : Internal Transcribed Spacer

ITZ : Itraconazole

IVZ : Isavuconazole

**K**

---

K : Lysine

Kb : kilobases

**L**

---

Leu : Leucine

Lys : Lysine

## **M**

---

MALDI-TOF : Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight

Mb : Mégabase

MDP : Mannitol 1P déshydrogénase

Met : Méthionine

MFS : Major Facilitator Superfamily

MLST : MultiLocus Sequence Typing

## **P**

---

PAS : Periodic Acid Schiff

PBS : Phosphate Buffer Saline

PCR : Réaction de polymérisation en chaîne

PSZ : Posaconazole

## **R**

---

R : Anti-sens (reverse)

RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium

## **S**

---

SBD : Sabouraud Dextrose Broth

SOD : Superoxyde dismutase

## **T**

---

Taq : *Thermophilus aquaticus*

TEF : Facteur d'élongation

Thr : Thréonine

## **V**

---

Val : Valine

VIH : Virus de l'Immunodéficience Humaine

VRZ : Voriconazole

## **W**

---

WT : Wild Type



# TABLE DES MATIÈRES

<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>III</b>
<b>ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>VII</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>XI</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>XV</b>
1. FIGURES.....	XV
2. TABLEAUX .....	XVIII
<b>INTRODUCTION GÉNÉRALE</b> .....	<b>1</b>
<b>PREMIERE PARTIE : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE SUR LES INFECTIONS A <i>FUSARIUM</i> CHEZ L'HOMME</b> .....	<b>5</b>
1. GENRE <i>FUSARIUM</i> ET FOCUS SUR LE COMPLEXE D'ESPECES <i>FUSARIUM SOLANI</i> .....	7
1.1. <i>Ecologie</i> .....	7
1.2. <i>Taxinomie</i> .....	7
1.3. <i>Caractéristiques morphologiques</i> .....	9
1.4. <i>Génome</i> .....	15
2. EPIDEMIOLOGIE .....	16
3. PHYSIOPATHOLOGIE .....	18
4. PRINCIPALES FORMES CLINIQUES .....	19
4.1. <i>Onychomycoses</i> .....	19
4.2. <i>Kératites</i> .....	22
4.3. <i>Mycétomes</i> .....	24
4.4. <i>Infections cutanées</i> .....	26
4.5. <i>Sinusites</i> .....	27
4.6. <i>Fusarioses invasives</i> .....	28
5. DIAGNOSTIC EN CLINIQUE .....	31
5.1. <i>Examen direct</i> .....	31
5.2. <i>Culture</i> .....	32
5.3. <i>Immunodiagnostic</i> .....	33

5.4. Identification phénotypique .....	34
5.5. Spectrométrie de masse .....	37
5.6. Biologie moléculaire .....	39
6. TRAITEMENT ET ANTIFONGIQUES.....	41
6.1. Profil de sensibilité.....	41
6.2. Recommandations et stratégies thérapeutiques .....	43
6.2.1. Onychomycoses.....	43
6.2.2. Kératites .....	44
6.2.3. Mycétomes.....	45
6.2.4. Infections cutanées .....	45
6.2.5. Fusarioses invasives .....	46
<b>DEUXIEME PARTIE : EXPLORATION DES MECANISMES DE RESISTANCE AUX AZOLES CHEZ LE COMPLEXE D'ESPECES <i>FUSARIUM SOLANI</i></b> .....	<b>49</b>
1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE .....	51
1.1. Résistance aux antifongiques azolés .....	51
1.2. Mutation de CYP51, cible des azolés .....	53
1.3. Efflux et transporteurs.....	55
1.4. Coût d'adaptation ou « Fitness cost ».....	56
2. PROBLEMATIQUE .....	58
3. DETERMINATION DES CMI.....	59
3.1. Matériels et méthodes .....	59
3.1.1. Souches étudiées.....	59
3.1.2. Préparation des solutions antifongiques .....	60
3.1.3. Préparation de l'inoculum.....	60
3.1.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et effectrices en microdilution .....	61
3.2. Résultats .....	61
3.3. Discussion .....	63
4. ANALYSE DU FITNESS COST .....	64
4.1. Matériels et méthodes .....	64
4.1.1. Courbe de croissance .....	64
4.1.2. Etude de la virulence des souches FSSC par le modèle <i>Galleria mellonella</i> .....	64
4.1.3. Examen anatomopathologique d'une larve de <i>Galleria mellonella</i> infectée par FSSC..	67

4.1.4. Etude de la sensibilité des souches FSSC aux antifongiques <i>in vivo</i> dans le modèle <i>Galleria mellonella</i> .....	67
<b>4.2. Résultats</b> .....	<b>68</b>
4.2.1. Courbe de croissance .....	68
4.2.2. Etude de la virulence des souches FSSC par le modèle <i>Galleria mellonella</i> .....	70
4.2.3. Description anatomopathologique de l'infection à <i>Fusarium</i> chez <i>Galleria mellonella</i> .....	72
4.2.4. Etude de la sensibilité aux antifongiques <i>in vivo</i> dans le modèle <i>Galleria mellonella</i> ... ..	74
<b>4.3. Discussion</b> .....	<b>76</b>
<b>5. MODIFICATION QUALITATIVE DE LA CIBLE</b> .....	<b>79</b>
<b>5.1. Matériels et méthodes</b> .....	<b>79</b>
5.1.1. Amplification et séquençage des gènes <i>CYP51A</i> , <i>B</i> et <i>C</i> .....	79
5.1.2. Analyse bioinformatique .....	79
5.1.3. Comparaison des mutations des protéines <i>CYP51A</i> , <i>B</i> et <i>C</i> .....	80
5.1.4. Comparaison avec d'autres complexes d'espèces de <i>Fusarium</i> .....	81
5.1.5. Modélisation de la protéine <i>CYP51A</i> .....	81
<b>5.2. Résultats</b> .....	<b>82</b>
5.2.1. Profils protéiques de <i>CYP51A</i> , <i>B</i> et <i>C</i> .....	82
5.2.2. Comparaison des mutations des protéines <i>CYP51A</i> , <i>B</i> et <i>C</i> .....	83
5.2.3. Modélisation de la protéine <i>CYP51A</i> .....	84
5.2.4. Comparaison avec d'autres complexes d'espèces de <i>Fusarium</i> .....	89
<b>5.3. Discussion</b> .....	<b>90</b>
<b>6. EFFLUX ET RESISTANCE</b> .....	<b>94</b>
<b>6.1. Matériels et méthodes</b> .....	<b>94</b>
6.1.1. Evaluation de l'impact de l'efflux sur la résistance par cytométrie en flux .....	94
6.1.2. Mise en culture avec exposition au voriconazole .....	95
6.1.3. Expression génique en présence d'antifongique .....	95
6.1.3.1. Choix du gène de référence .....	95
6.1.3.2. Expression génique d' <i>ABC1</i> .....	97
<b>6.2. Résultats</b> .....	<b>98</b>
6.2.1. Evaluation de l'impact de l'efflux sur la résistance par cytométrie en flux .....	98
6.2.2. Expression génique en présence d'antifongique .....	99
6.2.2.1. Gène de référence .....	99
6.2.2.2. Expression génique d' <i>ABC1</i> .....	101
<b>6.3. Discussion</b> .....	<b>103</b>
<b>7. EVOLUTION EXPERIMENTALE ET EXPRESSION GENIQUE</b> .....	<b>106</b>

<i>7.1. Matériels et méthodes</i> .....	106
7.1.1. Evolution expérimentale de la résistance au voriconazole.....	106
7.1.2. Évaluation de la mutagénèse de <i>CYP51A</i> .....	107
7.1.3. Evaluation des variations d'expression de <i>CYP51A</i> et <i>ABC1</i> .....	108
<i>7.2. Résultats</i> .....	109
7.2.1. Evolution expérimentale de la résistance au voriconazole.....	109
7.2.2. Évaluation de la mutagénèse de <i>CYP51A</i> .....	110
7.2.3. Évaluation des variations d'expression de <i>CYP51A</i> et <i>ABC1</i> .....	110
7.2.3.1. Expression génique de <i>CYP51A</i> .....	110
7.2.3.2. Expression génique d' <i>ABC1</i> .....	112
<i>7.3. Discussion</i> .....	114
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES</b> .....	<b>119</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>125</b>

# TABLE DES ILLUSTRATIONS

## 1. FIGURES

FIGURE 1 : MORPHOLOGIE DES COLONIES DES DIFFERENTES ESPECES DE <i>FUSARIUM</i> SUR GELOSE DEXTROSE DE POMME DE TERRE. ....	10
FIGURE 2 : CARACTERES MORPHOLOGIQUES DES SPORES ET LEUR PRODUCTION (D'APRES LESLIE ET SUMMERELL, 2006 [12]) .....	11
FIGURE 3 : DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DE <i>FUSARIUM SOLANI</i> (CBS 142372) (D'APRES ŠISIC ET AL., 2018 [14])	13
FIGURE 4 : DESCRIPTION MORPHOLOGIQUE DE CHLAMYDOSPORES DE <i>FUSARIUM SOLANI</i> F. SP. <i>CUCURBITAE</i> (D'APRES PEREZ-HERNANDEZ ET AL., 2020 [15]) .....	14
FIGURE 5 : FREQUENCES DES COMPLEXES D'ESPECES DE <i>FUSARIUM</i> ISSUS DE PRELEVEMENTS CLINIQUES (N=717) (D'APRES SHORT ET AL., 2011 [39]) .....	17
FIGURE 6 : DIFFERENTES INFECTIONS DE LA PLAQUE UNGUEALE (D'APRES BARAN ET AL. 2007 [57]) .....	20
FIGURE 7 : ONYCHOMYCOSE SOUS-UNGUEALE DISTOLATERALE (LEUNG ET AL. 2020 [58]) .....	21
FIGURE 8 : ONYCHOMYCOSE SOUS-UNGUEALE PROXIMALE (LEUNG ET AL. 2020 [58]) .....	21
FIGURE 9 : LEUCONYCHOMYCOSE SUPERFICIELLE (BARAN ET AL. 2007 [57]).....	21
FIGURE 10 : KERATITE A <i>FUSARIUM OXYSPORUM</i> (PRESENCE D'UN INFILTRAT BLANC OPAQUE AVEC UNE MARGE TROUBLE) CHEZ UN PATIENT DE 57 ANS, PORTEUR DE LENTILLES DE CONTACT (D'APRES SZALINSKI ET AL. 2021 [75]) .....	23
FIGURE 11 : KERATITE SEVERE A <i>FUSARIUM</i> SPP., SUITE A UNE MAUVAISE UTILISATION DES LENTILLES DE CONTACT ET A UN TRAITEMENT INITIAL PROLONGE ET INADEQUAT (D'APRES SZALINSKI ET AL. 2021 [75]) .....	24
FIGURE 12 : EUMYCETOME A <i>FUSARIUM SOLANI</i> VAR <i>KERATOPLASTICUM</i> PRESENTANT DE MULTIPLES NODULES SOUS-CUTANES AVEC ECOULEMENTS DE GRAINS (D'APRES CORREIA ET AL., 2022 [82]) .....	25
FIGURE 13 : MYCETOME DU PIED A GRAINS NOIRS (STADE DE « PIED DE MADURA ») (D'APRES DEVELOUX, 2016 [76]) .....	26
FIGURE 14 : LESIONS ULCEREUSES A <i>FUSARIUM</i> SP. AU NIVEAU DE LA FACE ANTERIEURE DE LA JAMBE GAUCHE (D'APRES PEREZ-PEREZ ET AL., 2007 [87]).....	27
FIGURE 15 : LESIONS CUTANEEES A <i>F. SOLANI</i> CHEZ UNE PATIENTE ATTEINTE DE LEUCEMIE AIGUE LYMPHOBLASTIQUE (D'APRES YU ET AL., 2019 [108]).....	30
FIGURE 16 : NODULES CUTANES A <i>FUSARIUM</i> , CHEZ UN PATIENT GREFFE DE CELLULES SOUCHES HEMATOPOÏETIQUES (D'APRES NUCCI ET AL., 2015 [109]).....	30

FIGURE 17 : HYPHES DE <i>FUSARIUM SOLANI</i> A LA COLORATION ACIDE PERIODIQUE DE SCHIFF (D'APRES BANERJI ET SINGH J, 2011 [111]).....	31
FIGURE 18 : A-HYPHES FONGIQUES D' <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> CONFIRMES PAR CULTURE (COLORATION HE) ; B-HYPHES FONGIQUES DE <i>FUSARIUM SP.</i> (COLORATION HE) (D'APRES MONTONE, 2009 [112]) .....	32
FIGURE 19 : CARACTERISTIQUES MACROSCOPIQUES (A) ET MICROSCOPIQUES DE <i>F. SOLANI</i> (B, D : MACROCONIDIES, C : MONOPHIALIDES, E : MICROCONIDIES, F : CHLAMYDOSPORES) (D'APRES DE HOOG GS, ET AL. 2020 [11]) .....	37
FIGURE 20 : SPECTRES DE MASSE MALDI-TOF DES DIFFERENTES SOUCHES DE <i>FUSARIUM</i> (D'APRES MARINACH-PATRICE ET AL., 2009 [126]).....	38
FIGURE 21 : MECANISMES DE RESISTANCE AUX AZOLES CHEZ LES CHAMPIGNONS .....	53
FIGURE 22 : MECANISME D'ACTION DES AZOLES .....	55
FIGURE 23 : DISTRIBUTION DES CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI) ( $\mu\text{G}/\text{ML}$ ) AUX DIFFERENTS ANTIFONGIQUES POUR LES 17 SOUCHES DE FSSC (VRZ : VORICONAZOLE, ITS : ITRACONAZOLE, PSZ : POSACONAZOLE, IVZ : ISAVUCONAZOLE, * : VALEURS DE CMI SUPERIEURES A 16 $\mu\text{G}/\text{ML}$ , AXE DES ORDONNES EN ECHELLE LOGARITHMIQUE DE 2 (LOG2)).....	62
FIGURE 24 : MODELE INVERTEBRE <i>IN VIVO</i> : <i>GALLERIA MELLONELLA</i> .....	66
FIGURE 25 : COURBES DE CROISSANCE DES DIFFERENTES SOUCHES FSSC .....	69
FIGURE 26 : COURBES DE CROISSANCE DES SOUCHES FSSC EVALUEES (MOYENNE : COURBE ROUGE) OU REPARTIES SELON LEUR CONCENTRATION MINIMALE INHIBITRICE AU VORICONAZOLE (2-4 $\mu\text{G}/\text{ML}$ : COURBE VERTE ET 8-16 $\mu\text{G}/\text{ML}$ : COURBE BLEUE) .....	70
FIGURE 27 : COURBES DE SURVIE DE GROUPES DE LARVES DE <i>G. MELLONELLA</i> INOCULEES AVEC DES SOUCHES DE FSSC REPARTIES SELON LEURS CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES AU VORICONAZOLE (CMI).....	71
FIGURE 28 : COURBES DE SURVIE DE GROUPES DE LARVES DE <i>G. MELLONELLA</i> INOCULEES AVEC DES SOUCHES DE FSSC REPARTIES SELON LEURS ORIGINES CLINIQUES OU ENVIRONNEMENTALES.....	72
FIGURE 29 : HISTOPATHOLOGIE DE LARVES DE <i>GALLERIA MELLONELLA</i> INFECTEES PAR LA SOUCHE FSSC86 24 HEURES APRES INOCULATION. LES LARVES N'ONT PAS ETE TRAITEES PAR DU VORICONAZOLE. OBSERVATION DE FILAMENTS SEPTES ET SPORES EN COURS DE GERMINATION (COUPE SAGITTALE APRES COLORATION DE GOMORI-GROCOTT (A) ET A L'HEMALUN-EOSINE-SAFRAN HES (B)).....	73
FIGURE 30 : COURBES DE SURVIE DE LARVES DE <i>G. MELLONELLA</i> INFECTEES PAR LES SOUCHES DE FSSC ET TRAITEES AVEC 64 $\mu\text{G}/\text{LARVE}$ DE VORICONAZOLE 2 H APRES L'INFECTION .....	75
FIGURE 31 : COURBES DE SURVIE DE GROUPES DE LARVES DE <i>G. MELLONELLA</i> INFECTEES PAR LES SOUCHES DE FSSC REPARTIES SELON LEURS CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES AU VORICONAZOLE (CMI) ET TRAITEES AVEC 64 $\mu\text{G}/\text{LARVE}$ DE VORICONAZOLE 2 H APRES L'INFECTION .....	76
FIGURE 32 : MODELE CONFORMATIONNEL DE LA PROTEINE CYP51A DE FSSC. ....	85
FIGURE 33 : REPRESENTATION TRIDIMENSIONNELLE DES ACIDES AMINES LEUCINE (L) ET ISOLEUCINE (I) (D'APRES BERNTSON ET CACIOPPO, 2012 [257]) .....	86
FIGURE 34 : REPARTITION DES DIFFERENTES POPULATIONS DE CONIDIES DE LA SOUCHE FSSC47 PAR CYTOMETRIE EN FLUX EN ABSENCE (A, B) OU PRESENCE (C, D) DE GLUCOSE A T <sub>0</sub> (A,C) ET T <sub>30</sub> (B, D) (P1 : POPULATION AYANT INTERNALISEE LA R6G, P2 : POPULATION SANS FLUORESCENCE, FITC : CANAL DE MESURE DE FLUORESCENCE, FSC : CANAL DE MESURE SELON LA TAILLE DES CELLULES).....	99

FIGURE 35 : VARIABILITE DES VALEURS DE CYCLE SEUIL (CT POUR CYCLE THRESHOLD) DE CHAQUE GENE EN FONCTION DES CONDITIONS DE CULTURE .....	101
FIGURE 36 : EXPRESSION DU GENE <i>ABC1</i> NORMALISEE PAR LE GENE <i>MDP</i> , A DIFFERENTS TEMPS D'EXPOSITION AU VORICONAZOLE A CONCENTRATION CMI ½ DES FSSC20 (N=2), FSSC102 (N=2), FSSC45 (N=1), FSSC98 (N=3), FSSC118 (N=3), FSSC47 (N=2) ET LEURS CMI RESPECTIVES .....	102
FIGURE 37 : EXPRESSION DU GENE <i>ABC1</i> NORMALISEE PAR LE GENE <i>MDP</i> , A DIFFERENTS TEMPS D'EXPOSITION AU VORICONAZOLE A CONCENTRATION CMI ¼ DES SOUCHES FSSC20 (N=2), FSSC102 (N=2), FSSC45 (N=1), FSSC98 (N=3), FSSC118 (N=3), FSSC47 (N=2) ET LEURS CMI RESPECTIVES.....	103
FIGURE 38 : ÉVOLUTION EXPERIMENTALE DE FSSC EN PRESENCE DE CONCENTRATION SUB-INHIBITRICE DE VORICONAZOLE .....	107
FIGURE 39 : REPARTITION DU NIVEAU D'EXPRESSION DE L'ARNM <i>CYP51A</i> NORMALISES PAR <i>MDP</i> POUR LES SOUCHES FSSC20 ET 102 SUR 14 GENERATIONS EN PRESENCE OU NON DE VORICONAZOLE (ECHELLE LOGARITHMIQUE LOG <sub>2</sub> , TRAIT : MEDIANE, MOUSTACHES : VALEURS MINIMALES ET MAXIMALES, I : INDUCTION PAR VORICONAZOLE) .....	111
FIGURE 40 : ÉVOLUTION DE L'EXPRESSION DE <i>CYP51A</i> NORMALISEE PAR <i>MDP</i> EN COURS DES GENERATIONS POUR LES SOUCHES FSSC20 ET FSSC102 EN PRESENCE DE VORICONAZOLE (ECHELLE LOGARITHMIQUE LOG <sub>2</sub> , I : INDUCTION PAR VORICONAZOLE).....	112
FIGURE 41 : REPARTITION DU NIVEAU D'EXPRESSION DE L'ARNM <i>ABC1</i> NORMALISEE PAR <i>MDP</i> POUR LES SOUCHES FSSC20 ET 102 SUR 14 GENERATIONS EN PRESENCE OU NON DE VORICONAZOLE (ECHELLE LOGARITHMIQUE LOG <sub>2</sub> , TRAIT : MEDIANE, MOUSTACHES : VALEURS MINIMALES ET MAXIMALES, I : INDUCTION PAR VORICONAZOLE) .....	113
FIGURE 42 : ÉVOLUTION DE L'EXPRESSION DE <i>ABC1</i> NORMALISEE PAR <i>MDP</i> EN COURS DES GENERATIONS POUR LES SOUCHES FSSC20 ET FSSC102 EN PRESENCE DE VORICONAZOLE (ECHELLE LOGARITHMIQUE LOG <sub>2</sub> , I : INDUCTION PAR VORICONAZOLE).....	114

## 2. TABLEAUX

TABLEAU 1 : CLASSIFICATION TAXINOMIQUE DU GENRE <i>FUSARIUM</i> (D'APRES O'DONNELL <i>ET AL.</i> , 2020 [8]) .....	8
TABLEAU 2 : ALGORITHME D'IDENTIFICATION PHENOTYPIQUE DES <i>FUSARIUM</i> (D'APRES DE HOOG <i>GS, ET AL.</i> 2020 [11]) .....	35
TABLEAU 3 : DISTRIBUTION DES CMI DE DIFFERENTS ANTIFONGIQUES POUR LES COMPLEXES FOSC ET FSSC, DETERMINEES PAR LA METHODE DE MICRODILUTION CLSI (D'APRES ESPINEL-INGROFF <i>ET AL.</i> , 2016 [142]) .....	42
TABLEAU 4 : SOUCHES UTILISEES POUR LE PROJET RAFU (CARACTERISTIQUES ET GENOTYPES) .....	59
TABLEAU 5 : MEDIANE ET INTERVALLES DES CMI AUX ANTIFONGIQUES .....	62
TABLEAU 6 : SOUCHES UTILISEES POUR L'ETUDE DE SURVIE <i>IN VIVO</i> (13 SOUCHES) ET POUR L'ETUDE DE CROISSANCE (7 SOUCHES SOULIGNEES) (REFERENCES ET CMI AU VORICONAZOLE (CMI <sub>VRZ</sub> ), BLEU : GROUPE CMI 2-4 µG/ML, ORANGE : GROUPE CMI 8-16 µG/ML) .....	67
TABLEAU 7 : AMORCES UTILISEES POUR AMPLIFIER LES GENES <i>CYP51A</i> , <i>CYP51B</i> ET <i>CYP51C</i> .....	79
TABLEAU 8 : REFERENCES DES GENES ET ARNMS DE <i>FUSARIUM VANETTENII</i> MPVI 77-13-4 UTILISES DANS CETTE ETUDE .....	80
TABLEAU 9 : REFERENCES DES SEQUENCES PROTEIQUES <i>CYP51A</i> , B ET C DES SOUCHES D' <i>ASPERGILLUS</i> SP. UTILISEES DANS NOS COMPARAISONS .....	80
TABLEAU 10 : REFERENCES DES SEQUENCES PROTEIQUES <i>CYP51A</i> DES COMPLEXES D'ESPECE DE <i>FUSARIUM</i> UTILISEES POUR NOS COMPARAISONS .....	81
TABLEAU 11 : CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI) DES SOUCHES FSSC POUR LES ANTIFONGIQUES AZOLES .....	82
TABLEAU 12 : COMPARAISON DES MODIFICATIONS D'ACIDES AMINES DE <i>CYP51A</i> OBSERVES CHEZ NOS SOUCHES FSSC AVEC CELLES ASSOCIEES A UNE RESISTANCE AUX AZOLES CHEZ <i>A. FUMIGATUS</i> .....	83
TABLEAU 13 : MUTATIONS D'INTERET DE <i>CYP51A</i> OBSERVEES CHEZ LES SOUCHES FSSC ET LES SOUCHES D' <i>ASPERGILLUS FUMIGATUS</i> RESISTANTS AUX AZOLES .....	86
TABLEAU 14 : POINTS DE MUTATION DES SOUCHES FSSC ETUDIEES SELON LEURS CONCENTRATIONS MINIMALES INHIBITRICES (CMI) AU VORICONAZOLE ET LOCALISATION DE L'ACIDE AMINE PAR RAPPORT A L'ENTREE DU CANAL DU SUBSTRAT .....	88
TABLEAU 15 : COMPARAISON DES 5 MUTATIONS D'INTERET DE <i>CYP51A</i> ENTRE LES SOUCHES ETUDIEES ET D'AUTRES SOUCHES DE DIFFERENTS COMPLEXES D'ESPECES .....	90
TABLEAU 16 : SOUCHES DE FSSC ETUDIEES DANS L'EXPRESSION GENIQUE D' <i>ABC1</i> EN PRESENCE DE VORICONAZOLE A DIFFERENTES CONCENTRATIONS (N : REPLICAT BIOLOGIQUE) .....	95
TABLEAU 17 : GENES DE REFERENCE ET LEURS AMORCES UTILISEES POUR CETTE ETUDE .....	96
TABLEAU 18 : CONDITIONS DE CULTURE EVALUEES POUR DETERMINATION DU GENE DE REFERENCE LE PLUS STABLE (RPMI : MILIEU RPMI, SBD : SABOURAUD, TA : TEMPERATURE AMBIANTE) .....	97

TABLEAU 19 : AMORCES UTILISES POUR QUANTIFIER L'EXPRESSION DU GENE <i>ABC1</i> ( <i>MDP</i> : GENE DE REFERENCE) ....	98
TABLEAU 20 : GENES DE REFERENCE EVALUES ET LEURS VALEURS DE STABILITE OBTENUES PAR L'ALGORITHME NORMFINDER.....	100
TABLEAU 21 : GENES DE REFERENCE EVALUES PAR COMPARAISON DES COEFFICIENTS DE VARIATION (CV).....	100
TABLEAU 22 : AMORCES UTILISES POUR QUANTIFIER L'EXPRESSION DU GENE <i>CYP51A</i> ET <i>ABC1</i> ( <i>MDP</i> : GENE DE REFERENCE).....	108
TABLEAU 23 : ÉVOLUTION DES CMI AU VORICONAZOLE POUR LES SOUCHES FSSC20 ET FSSC102 EN PRESENCE (VRZ) OU NON (TEMOIN) DE VORICONAZOLE A CONCENTRATION SUB-INHIBITRICE (NA : NON APPLICABLE ; ND : DONNEES NON DISPONIBLES).....	109



# **INTRODUCTION**

## **GENERALE**



Les maladies infectieuses sont l'une des principales causes de décès à travers le monde. Parmi les agents impliqués, les champignons microscopiques ou micromycètes occupent une place importante à considérer. Il s'agit d'organismes eucaryotes ubiquitaires dans l'environnement. Présentant deux modes de vie distincts, parasites ou saprophytes, ils sont capables d'obtenir les nutriments nécessaires à leur développement, respectivement à partir d'hôtes vivants ou de matières organiques en décomposition. Les micromycètes ont un pouvoir pathogène pouvant toucher les plantes mais également l'Homme. Ainsi, les conséquences sur la santé humaine sont importantes.

Cependant, les infections fongiques sont dites majoritairement opportunistes. En effet, le champignon nécessite la présence de conditions spécifiques chez l'hôte pour se développer et induire une infection. Il existe un nombre très important d'espèces de micromycètes dans le monde. En pathologie humaine, seulement quelques centaines d'espèces sont associées à des infections. Les micromycètes peuvent être unicellulaires ou pluricellulaires et se présenter, en clinique, sous formes levures ou filamenteuses. Au sein de cette forme filamenteuse, deux groupes se distinguent : les dermatophytes et les moisissures, comme celles appartenant au genre *Fusarium*.

Le genre *Fusarium* est décrit depuis quelques décennies comme agent d'infections fongiques chez l'Homme. La sévérité de celles-ci varie selon leur localisation, pouvant être bénignes (atteintes superficielles ou des muqueuses) ou graves. Dans ce cas, elles sont dites « invasives », responsables d'infections systémiques et profondes, et peuvent engager le pronostic vital. Le nombre de cas d'infections fongiques invasives (IFI) n'a cessé de croître ces 20 dernières années.

L'arsenal thérapeutique pour le traitement des infections à *Fusarium* ou fusarioses est très limité. En effet, le genre *Fusarium* présente une sensibilité diminuée à la plupart des antifongiques. Emises par l'ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) et l'ECMM (European Confederation of Medical Mycology), les recommandations de traitement des fusarioses sont l'utilisation du voriconazole, un antifongique de la classe des azolés. Malgré cela, de nombreuses études ont montré une grande variabilité de sensibilité à celui-ci.

La caractérisation des mécanismes de résistance impliqués dans la diminution de sensibilité aux azolés chez le genre *Fusarium*, et plus particulièrement au niveau du complexe d'espèces *F. solani*, est essentielle pour la prise en charge de la fusariose.

L'objectif du projet RAFU (Résistance aux Azolés chez *Fusarium*) est d'étudier les différents acteurs de la résistance aux azolés. Une première partie s'attardera sur l'étude du coût liée à la résistance du champignon aux antifongiques. La caractérisation des mécanismes de résistance débutera par l'étude des modifications qualitatives par mutation de la cible des azolés, *CYP51*. Ce travail se poursuivra par l'étude des phénomènes d'efflux chez *Fusarium solani*, pour ensuite se conclure par la recherche de modifications quantitatives par variation de l'expression *CYP51*, cible des azolés, mais celle également d'une protéine impliquée dans l'efflux des azolés, *ABC1*.

**PREMIERE PARTIE**

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

**SUR LES INFECTIONS A**

***FUSARIUM* CHEZ L'HOMME**



# 1. GENRE *FUSARIUM* ET FOCUS SUR LE COMPLEXE D'ESPECES *FUSARIUM SOLANI*

## 1.1. Ecologie

*Fusarium* est un genre de champignon filamenteux que l'on retrouve dans différentes sphères écologiques. Isolé dans le sol, l'eau, les plantes et même dans l'espace, les champignons du genre *Fusarium* sont capables de coloniser un grand nombre de substrats, dans des environnements et des zones climatiques variés. *Fusarium* est principalement décrit comme phytopathogène : il est responsable de la destruction de cultures agricoles et céréalières [1]. Au sein du genre *Fusarium*, il existe différents complexes d'espèces. Les plus décrits et répandus à travers le monde sont les complexes d'espèces *Fusarium solani* (FSSC), *Fusarium oxysporum* (FOSC), *Fusarium fujikuroi* (FFSC) et *Fusarium incarnatum equiseti* (FIESC) [1,2].

*Fusarium* est également retrouvé depuis quelques décennies comme agent d'infections fongiques chez l'Homme. Les infections causées par le genre *Fusarium* peuvent être superficielles, comme des atteintes unguéales, mais également plus profondes, avec une dissémination hématogène pouvant être mortelle. Les premiers cas d'infections à *Fusarium* isolés chez des patients dans la littérature correspondaient à une infection vésicale et une kératite fongique [3,4].

## 1.2. Taxinomie

Le genre *Fusarium* appartient aux champignons ascomycètes. Il a été décrit pour la première fois par Link, médecin, botaniste et naturaliste allemand en 1809 sous le nom de *Fusisporium* [5]. L'identification des membres du genre *Fusarium* a été assez difficile depuis cette première description. En 1935, Wollenweber et Reinking ont apporté une approche taxinomique pour classer les différentes espèces décrites jusqu'alors [6]. Cependant, les nombreux débats sur l'importance relative des caractères morphologiques existants, comme la morphologie des spores, et d'autres nouvellement identifiés, par exemple les cellules conidiogènes, ont entraîné

des changements constants de classification des différentes espèces. Dans les années 70, l'approche morphologique unique a été remplacée par la description d'espèces biologiques ou populations de reproduction, ainsi que par le concept d'espèces phylogénétiques [5,7]. La taxinomie du genre *Fusarium* est encore en constante évolution. Actuellement, l'identification et la classification des espèces par leurs caractéristiques morphologiques, biologiques et phylogénétiques sont les plus robustes.

Ainsi, le complexe d'espèces *Fusarium solani* suit la classification taxinomique suivante (Tableau 1) :

Tableau 1 : Classification taxinomique du genre *Fusarium* (d'après O'Donnell *et al.*, 2020 [8])

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

Récemment, la classification du complexe d'espèces *Fusarium solani* (FSSC) est soumise à controverse. Il est proposé de reclasser le FSSC dans un nouveau genre, *Neocosmospora*. En revanche, le point de vue opposé soutient que ce complexe doit rester inclus dans le genre *Fusarium*, comme option scientifique la plus pratique, étant définie et adoptée depuis longtemps [8–10]. Par souci de simplification, la dénomination *Fusarium* sera choisie pour l'ensemble de ce travail.

### 1.3. Caractéristiques morphologiques

Les cultures de *Fusarium* présentent des colonies avec des nuances de couleurs variées (du blanc crème au violet, en passant par le jaune et l'orange) selon les espèces (Figure 1). Le mycélium de *Fusarium* est souvent duveteux et cotonneux.

L'approche microscopique met en évidence un champignon appartenant aux hyalohyphomycètes. Il s'agit d'un micromycète composé d'un mycélium incolore et présentant des cloisons (septa). Au niveau des hyphes aériens se forment les cellules productrices de conidies ou cellules conidiogènes. Il est possible de les retrouver également sur des conidiophores plus ou moins courts selon l'espèce. Les conidies formées sont de deux types : macroconidies et microconidies (Figure 2).

Caractéristiques du genre *Fusarium*, les macroconidies correspondent à des conidies de grande taille, fusiformes et cloisonnées. Les cloisons sont uniquement transversales (phragmospores). D'aspect courbées et présentant une extrémité apicale et une base pédicellée (forme de talon), les macroconidies sont produites en basipétale au niveau des monophialides et souvent regroupées en masse.

Les microconidies ne sont pas systématiquement produites par toutes les espèces de *Fusarium*. Elles sont de structures plus petites, de formes variables, fusiformes, ovoïdes, piriformes ou ellipsoïdes. Elles peuvent être unicellulaires ou bicellulaires. Les cellules conidiogènes des microconidies peuvent être monophialidiques ou polyphialidiques et le mode de production est basipétale. Les microconidies sur les phialides peuvent être isolées, regroupées en chaîne ou s'agréger pour former de fausses têtes.

Il est possible d'observer également des chlamydospores. Il s'agit de structures hyalines à paroi lisse ou rugueuse. Leur production peut être terminale ou intercalaire. Elles peuvent être simples, doubles, en amas ou arrangées en chaîne. Leur apparition est souvent tardive dans la croissance du champignon [11,12].

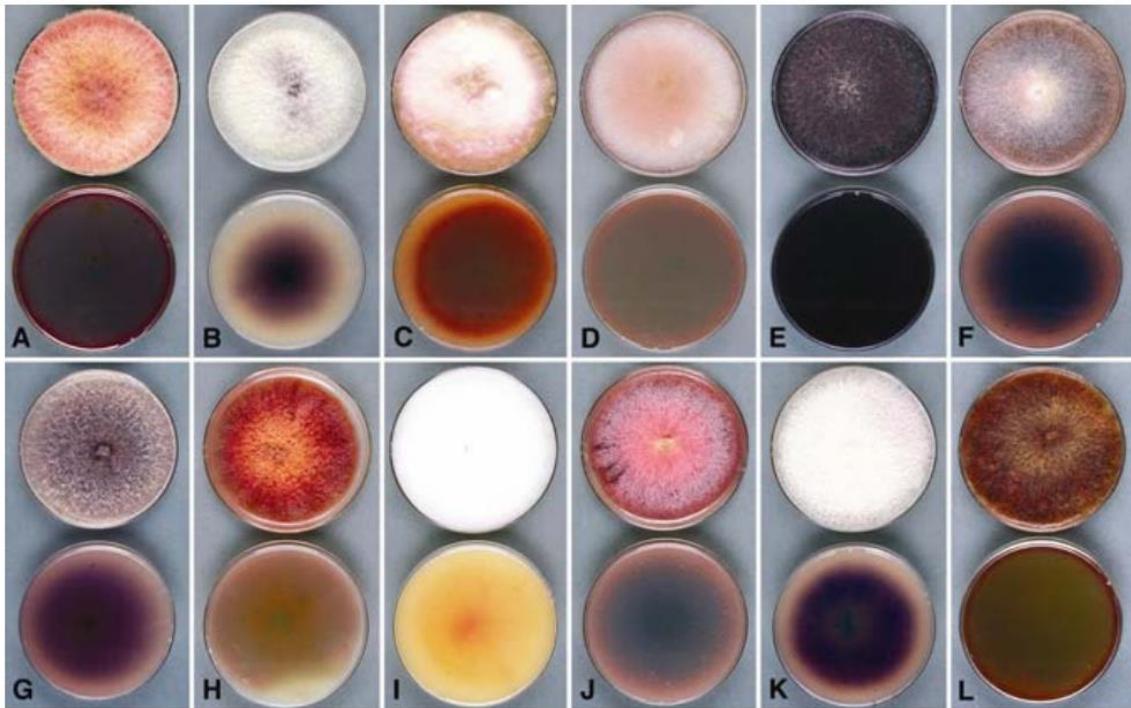


Figure 1 : Morphologie des colonies des différentes espèces de *Fusarium* sur gélose dextrose de pomme de terre.

Aspects recto et verso des cultures en boîtes de Pétri. **A**, *F. poae*. **B**, *F. oxysporum*. **C**, *F. acuminatum*. **D**, *F. nelsonii*. **E**, *F. subglutinans*. **F**, *F. nygamai*. **G**, *F. pseudonygamai*. **H**, *F. lateritium*. **I**, *F. thapsinum*. **J**, *F. decemcellulare*. **K**, *F. verticillioides*. **L**, *F. culmorum*. (d'après Summerell et al. 2003 [13])

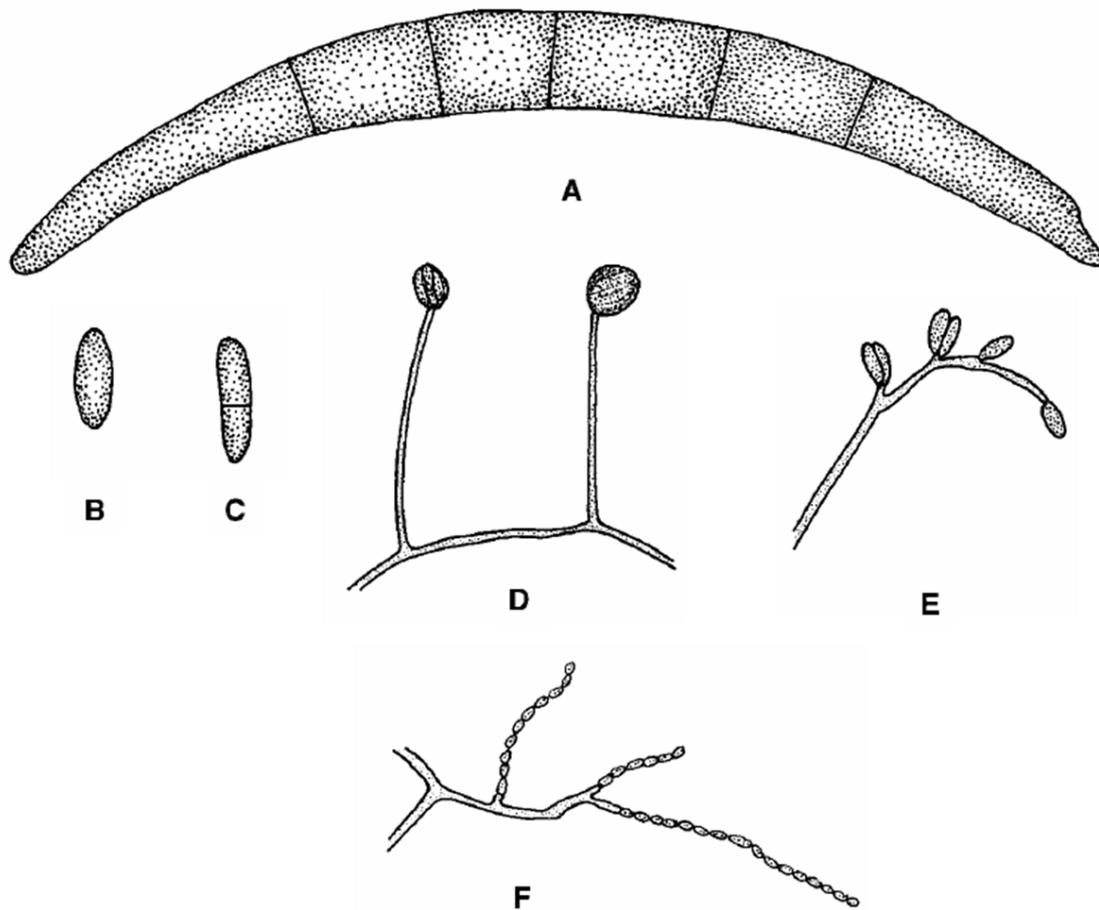


Figure 2 : Caractères morphologiques des spores et leur production (d'après Leslie et Summerell, 2006 [12])

**A.** macroconidie (apicale à gauche, basale à droite), **B.** microconidie unicellulaire, **C.** microconidie bicellulaire, **D.** monophialide, **E.** polyphialide, **F.** microconidies en chaîne

Dans le cas du complexe d'espèces *Fusarium solani*, la croissance fongique est rapide et donne un mycélium aérien duveteux de couleur blanche à crème, et pour certaines souches de couleur orange et violette. Le revers de la culture est incolore ou légèrement pâle (Figure 3A).

L'observation microscopique montre des conidiophores disposés de manière perpendiculaire au niveau des filaments aériens. Ils sont longs et de type monophialide (Figure 3B-D). Les macroconidies produites sont falciformes et généralement peu incurvées. La partie apicale est courte et il n'est généralement pas possible de distinguer la cellule basale. La majorité des macroconidies présentent des septas au nombre de 3 voire 5 occasionnellement. Elles mesurent environ 28-42  $\mu\text{m}$  de long pour 4-6  $\mu\text{m}$  de large (Figure 3E-F).

Contrairement à d'autres espèces de *Fusarium*, les microconidies sont souvent abondantes et produites quant à elles sur des conidiophores plus longs et verticillés. Leur taille varie entre 8 et 16  $\mu\text{m}$  de long pour 2 à 4,5  $\mu\text{m}$  de large (Figure 3C-D).

La présence de chlamydospores est souvent rapportée pour le complexe d'espèces *Fusarium solani*. Leur morphologie est très variable, lisse ou rugueuse, unique ou par paire. Elles peuvent être observées en position terminale ou intercalaire au niveau du filament mycélien. Elles mesurent entre 6 et 10  $\mu\text{m}$  de diamètre (Figure 4).

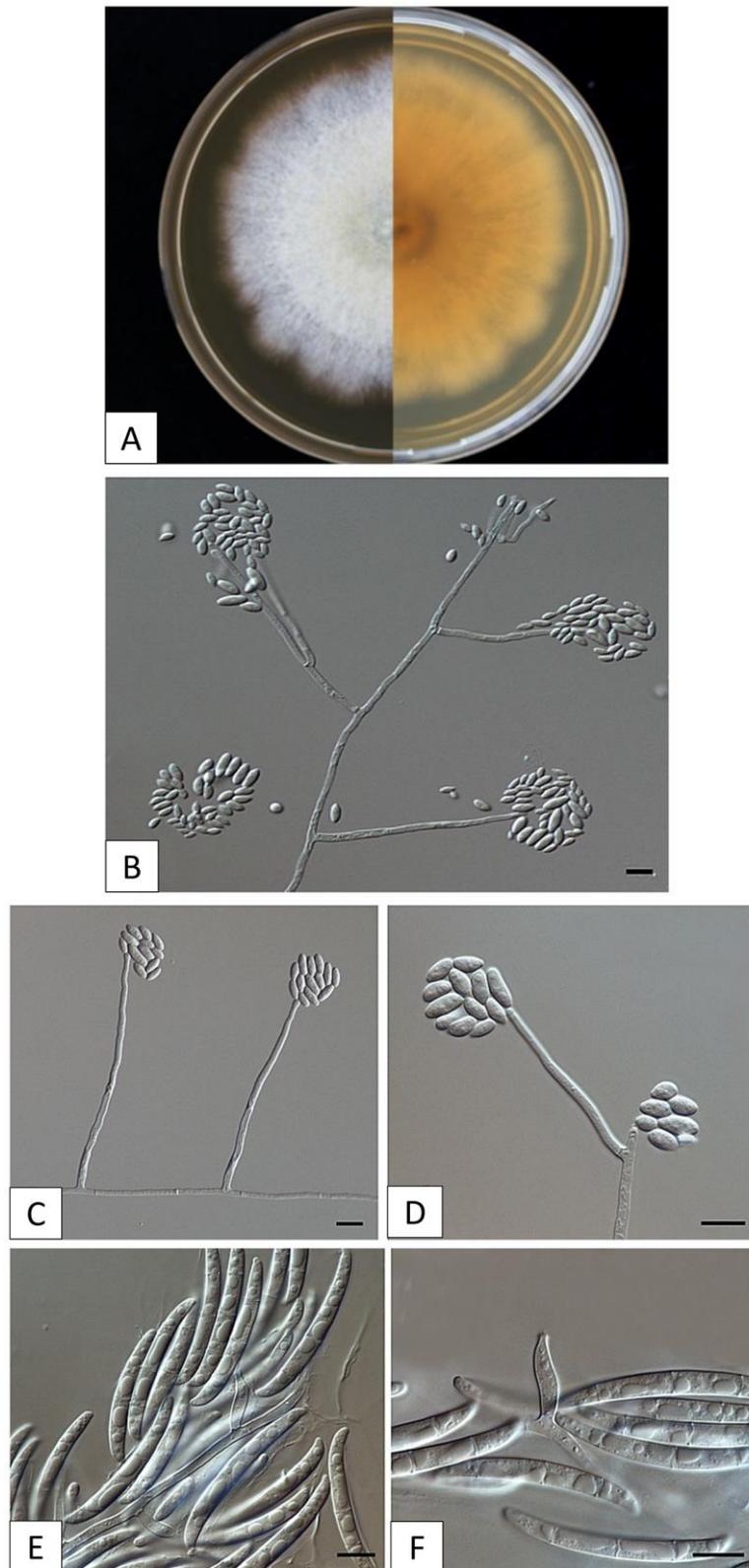


Figure 3 : Description morphologique de *Fusarium solani* (CBS 142372) (d'après Šišić *et al.*, 2018 [14])

(A : Croissance sur milieu à l'extrait de malt, B-D : Monophialides de grande taille avec fausses têtes et microconidies, E-F : Macroconidies. Barre d'échelle = 10 μm)

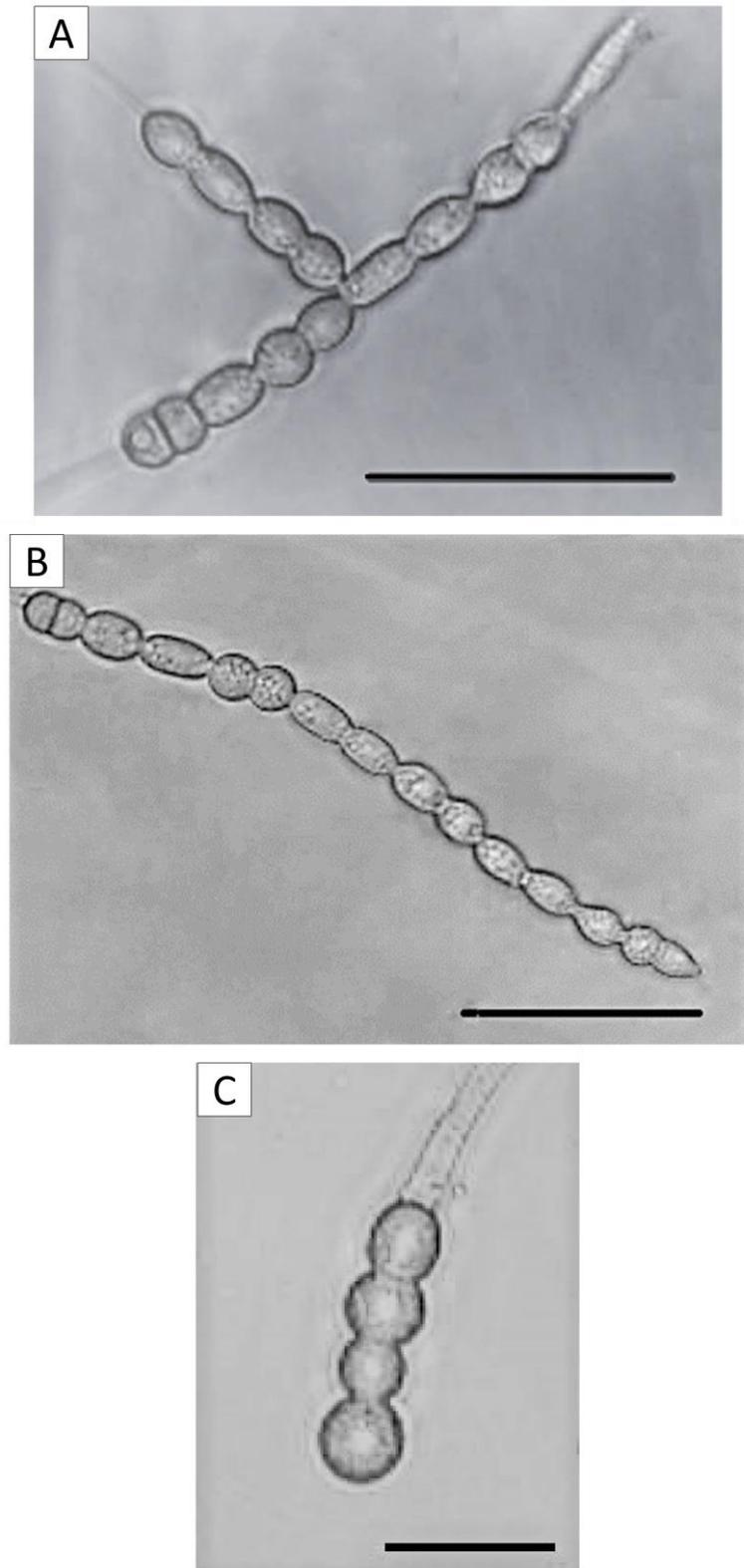


Figure 4 : Description morphologique de chlamydospores de *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae* (d'après Pérez-Hernández *et al.*, 2020 [15])

(**A-B** : Longues chaînes de chlamydospores intercalaires, **C** : Chlamydospores terminales. Barres d'échelle : **A** et **B** : 50  $\mu\text{m}$ , **C** : 20  $\mu\text{m}$ )

## 1.4. Génome

Le genre *Fusarium* présente un nombre plus important de chromosomes et une structure génomique plus complexe que les autres champignons plus simples tels que les levures. Les premières observations du génome de *Fusarium* ont permis de mettre en évidence un polymorphisme chromosomique important au niveau de la longueur des chromosomes mais également vis-à-vis de leur nombre apparent. Ce polymorphisme est particulièrement marqué chez les complexes d'espèces *Fusarium solani* et *Fusarium oxysporum* [5]. Il a été démontré que ce polymorphisme avait pour origine d'une part l'insertion, la délétion ou la translocation non réciproque de séquences répétées [16,17], mais également la présence de chromosomes surnuméraires. Ces derniers peuvent contenir des gènes codant des facteurs de virulence pour divers hôtes mais également des éléments transposables de longueur importante, potentiellement actifs, preuve de l'adaptation du champignon à son environnement [18–20].

Dans le cas du complexe d'espèces *Fusarium solani*, le génome a été obtenu à partir de la forme téléomorphe de *Fusarium solani*, la souche *Nectria haematococca* 77-13-44 en 2007 par the Joint Genome Institute, accessible sur le site <http://genome.jgi-psf.org/Necha2/Necha2.home.html> [21]. La souche présente 17 chromosomes de taille variable (530 kb à 6,52 Mb) avec un génome total mesurant 54,43 Mb et un nombre de gènes de 15 707.

Les chromosomes 14, 15 et 17 appartiennent à la catégorie des chromosomes surnuméraires (ils sont absents pour certaines souches après observation d'électrophorèses à champ pulsé). Ces chromosomes sont pauvres en résidus G et C en comparaison des autres chromosomes. Ils présentent de nombreuses séquences répétées et sont riches en gènes dupliqués ainsi qu'en gènes sans homologues chez les autres complexes de *Fusarium* [21].

Il a été montré que certains déterminants génétiques de virulence vis-à-vis d'un hôte spécifique étaient retrouvés dans les chromosomes surnuméraires, comme le locus *pea* pathogenicity (PEP) codant plusieurs facteurs influençant les lésions des épicotyles du pois, *Pisum sativum* [22].

## 2. EPIDEMIOLOGIE

Les champignons du genre *Fusarium* sont retrouvés partout dans le monde, que ce soit au niveau des régions tempérées ou tropicales. Certaines espèces ont été isolées dans des conditions climatiques extrêmes telles que des régions polaires, montagneuses ou désertiques [23]. *Fusarium* sp. est isolé de différentes matrices, comme l'air, l'eau, le sol, les plantes et les matières organiques [24,25]. Cette large distribution s'explique par sa capacité de se développer sur une gamme de substrats importante, sa résistance à des conditions de croissance variées, ainsi que par son mode de dispersion efficace [26]. Ces champignons filamenteux font partie des pathogènes les plus virulents affectant des hôtes de plusieurs règnes (transkingdom pathogen) [27].

Connu pour être colonisateur des parties aériennes des plantes, *Fusarium* sp. appartient à la mycoflore normale. Il est également décrit en tant que pathogène au niveau des cultures horticoles et céréalières. Les cultures infectées sont impropres à la consommation, entraînant de grandes pertes économiques dans le secteur de l'industrie agricole [23,28]. En 2012, les travaux de Dean *et al.* présentaient deux espèces de *Fusarium*, *F. graminearum* et *F. oxysporum*, parmi les 10 champignons décrits comme étant les plus pathogènes pour les plantes [29]. *Fusarium* sp. est responsable du flétrissement fusarien ou maladie incurable de Panama. Cette pathologie, touchant la banane, a causé la perte de la variété Gros Michel de la banane Cavendish dans les années 50 [30].

La prévalence des cas de fusariose signalés chez divers types d'animaux a augmenté au cours des dernières décennies. Il s'agissait principalement d'infections touchant des animaux aquatiques (tortues de mer, raies à tâches noires, phoques gris, dauphins et requins) mais également des animaux domestiques comme le chien. L'agent pathogène mis en cause était le plus souvent un isolat appartenant au complexe d'espèces *Fusarium solani* [31–34]. Les infections vétérinaires à *Fusarium* sont considérées maintenant comme une menace émergente, pouvant entraîner l'extinction des populations hôtes [35].

Pendant longtemps, le genre *Fusarium* était d'avantage catégorisé comme menace agronomique que médicale vis-à-vis de l'Homme. Cependant, suite à différents facteurs décrits précédemment, ce schéma de pensée a été revu et corrigé au cours des trois dernières décennies. En effet, *Fusarium* fait partie des pathogènes opportunistes majeurs chez l'humain. Constituant

une menace pour la santé chez certains patients, il est responsable d'un large éventail d'infections superficielles et systémiques, entraînant une morbidité élevée dans le premier cas et une mortalité importante dans le second [36,37]. Le genre *Fusarium* est classé en différents complexes d'espèces, et certains d'entre eux ont été décrits comme pathogènes humains, tels que les complexes d'espèces *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* ou *Fusarium fujikuroi*. Parmi eux, le complexe d'espèces *Fusarium solani* est le plus représenté. Une étude de 2011 a montré que FSSC représentait 60 % des isolats de *Fusarium* retrouvés dans des prélèvements cliniques divers (Figure 5) [38,39].

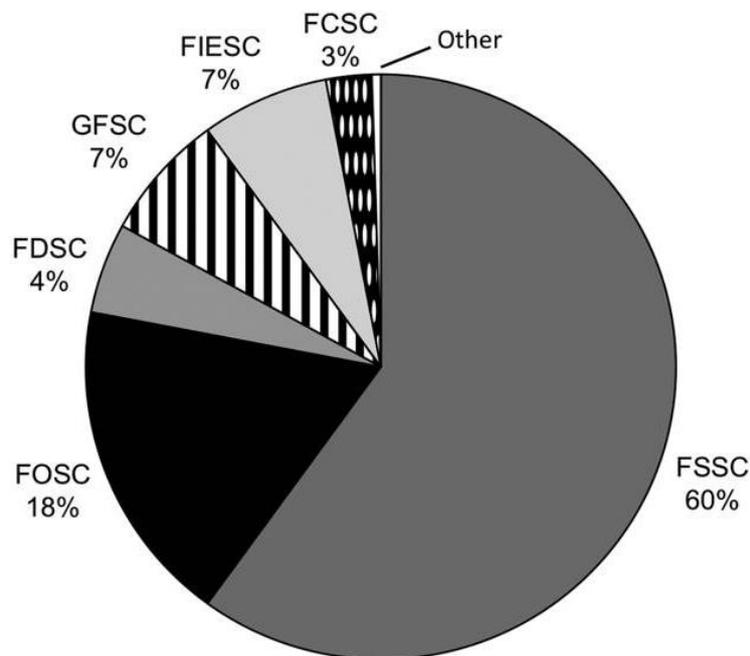


Figure 5 : Fréquences des complexes d'espèces de *Fusarium* issus de prélèvements cliniques (n=717) (d'après Short et al., 2011 [39])

(FDSC, complexe d'espèces de *Fusarium dimerum* ; FIESC, complexe d'espèces de *Fusarium incarnatum-equiseti* ; FOOSC, complexe d'espèces de *Fusarium oxysporum* ; FSSC, complexe d'espèces de *Fusarium solani*. GFSC, complexe d'espèces *Gibberella fujikuroi* ; FCSC, complexe d'espèces *Fusarium chlamydosporum*)

### 3. PHYSIOPATHOLOGIE

Certains facteurs favorisent l'apparition d'infections fongiques du genre *Fusarium*. Il peut s'agir d'une exposition massive au champignon, d'une altération de la barrière cutanéomuqueuse ou d'un déficit immunitaire [40]. Le genre *Fusarium* possède des facteurs de virulence lui conférant un pouvoir pathogène vis-à-vis des végétaux mais aussi de l'Homme [36].

*Fusarium* produit un grand nombre de composés chimiques appelés mycotoxines ou plus spécifiquement fusariotoxines. Les plus toxiques et ayant un impact significatif sur la santé humaine sont les trichothécènes, les fumonisines et la zéaralénone [41]. L'ingestion d'aliments contaminés par ces mycotoxines entraîne des manifestations variables pouvant aller d'une symptomatologie aiguë à chronique. Les effets peuvent être cancérigènes, tératogènes, hépatotoxiques et immunosuppresseurs [42,43].

En outre, les espèces de *Fusarium* ont la capacité de produire un biofilm leur permettant d'adhérer aux matériaux prothétiques, cathéters, mais également au niveau des lentilles de contact. La formation de biofilm correspond à la synthèse d'une matrice extracellulaire endogène constituée principalement par des polysaccharides, des protéines et du matériel génétique [44]. Le champignon devient ainsi plus résistant aux différentes molécules antifongiques [45,46].

Peu d'études se sont intéressées à la virulence de chaque espèce. Cependant, il a été montré dans une étude avec modèle murin de fusariose chez des souris immunocompétentes que le complexe d'espèces *Fusarium solani* présentait la plus forte virulence par rapport aux autres espèces étudiées (FOSC, FFSC, ...) [47]. Ces données ont également été observées dans un modèle d'infection *in vivo* utilisant les larves de *Galleria mellonella* [48].

## 4. PRINCIPALES FORMES CLINIQUES

### 4.1. Onychomycoses

Une onychomycose est définie comme une infection fongique de l'appareil unguéal et sa fréquence de survenue est d'environ 6 à 9 % dans la population générale [49]. L'atteinte d'un ongle ou onychopathie n'est pas synonyme d'onychomycose. Selon les études, l'onychomycose représente 18 à 50 % des onychopathies, les autres causes pouvant être des traumatismes ou d'autres affections dermatologiques [49]. La prévalence de l'onychomycose a augmenté au cours des dernières décennies. Les causes sont nombreuses, comme l'urbanisation ou l'augmentation du nombre de patients immunodéprimés [50]. L'onychomycose peut être provoquée par divers champignons. Les plus fréquents sont les dermatophytes (65 à 90 % des cas), ensuite les levures du genre *Candida* et enfin les moisissures [51,52]. Ces dernières représentent entre 4 et 22 % des infections fongiques de l'ongle, en fonction des zones géographiques et de la population étudiées [52]. Les principaux genres fongiques décrits comme agents d'onychomycose non dermatophytes sont *Scopulariopsis*, *Aspergillus*, *Fusarium* et *Scytalidium* [53]. L'implication réelle du champignon dans l'infection est parfois difficile à affirmer.

Il a déjà été démontré que l'onychomycose comme les atteintes cutanées peuvent être un facteur de risque de conduire à une fusariose invasive chez les patients immunodéficients [54]. Ainsi de nombreuses études se sont intéressées à la prévalence du genre *Fusarium* dans les atteintes unguéales. Il s'est avéré que la répartition mondiale des onychomycoses à *Fusarium* est dépendante des zones climatiques et des habitudes de vie de la population. La majorité des atteintes est diagnostiquée en Asie puis en Europe avec respectivement 39,5 % et 29,07 % des cas selon la revue de Uemura *et al.*[55]. Selon cette même étude, l'ongle de l'orteil est le principal site d'infection (46,5 % des cas). Cela s'explique par le fait que les espèces du genre *Fusarium* sont principalement retrouvées dans l'environnement, comme l'eau et la terre. Les activités avec un contact rapproché avec la terre et le déplacement pieds nus sont des facteurs favorisant la survenue d'onychomycose à *Fusarium* [55,56].

La forme clinique la plus fréquente induite par *Fusarium* est l'onychomycose sous-unguéale distolatérale, puis celle proximale suivie par la leuconychomycose superficielle (Figure 6). L'onychomycose sous-unguéale distolatérale peut être partielle ou totale. Le champignon

pénètre le plus souvent au niveau du sillon latéral de l'hyponychium. Il se développe et entraîne par la suite une hyperkératose sous-unguéale et un détachement de la tablette unguéale. Cette dernière est ensuite colonisée et l'extension du champignon peut atteindre la zone matricielle proximale (Figure 7). L'onychomycose sous-unguéale proximale est favorisée par un terrain immunodéprimé. Elle peut entraîner des atteintes profondes plus ou moins associées à des formes superficielles (Figure 8). La leuconychomycose superficielle est due à la pénétration du champignon au niveau de la tablette unguéale de l'extérieur vers l'intérieur, suite à un traumatisme local ou une macération par chevauchement d'orteils (Figure 9) [49,55,57].

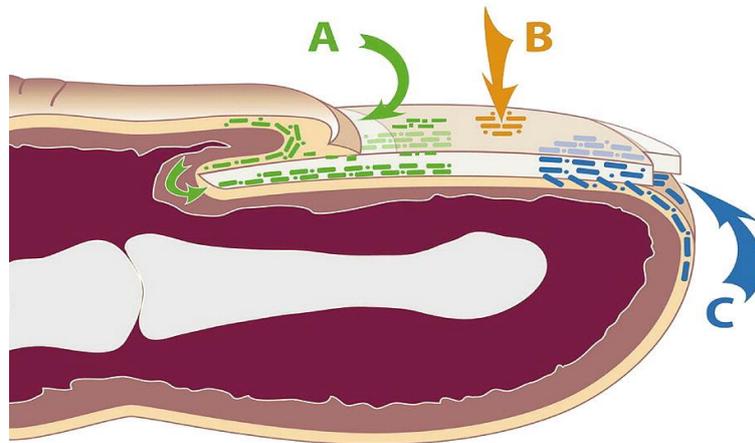


Figure 6 : Différentes infections de la plaque unguéale (d'après Baran *et al.* 2007 [57])

A. Onychomycose sous-unguéale proximale, B. Leuconychomycose superficielle, C. Onychomycose sous-unguéale distolatérale



Figure 7 : Onychomycose sous-unguéale distolatérale (Leung *et al.* 2020 [58])



Figure 8 : Onychomycose sous-unguéale proximale (Leung *et al.* 2020 [58])



Figure 9 : Leuconychomycose superficielle (Baran *et al.* 2007 [57])

## 4.2. Kératites

La kératite correspond à un ensemble de troubles inflammatoires aigus ou chroniques au niveau de la cornée, suite à des perturbations de la protection de la couche externe de l'œil. L'origine de l'inflammation peut être diverse, allergique, physique, chimique ou infectieuse [59]. La kératite infectieuse d'origine bactérienne, fongique, parasitaire ou virale, est connue comme étant l'une des maladies oculaires les plus graves. Elle est la principale cause de déficience visuelle et de cécité dans le monde [60]. L'incidence des kératites infectieuses, tout pathogène confondu, varie en fonction de la situation géographique et est estimée selon les études entre 2,5 et 800 cas pour 100 000 habitants/an. Ce type d'infections ne semble pas être lié à l'âge ni au genre [61]. La kératite bactérienne représente la catégorie de kératites infectieuses la plus répandue dans le monde (79-93 %) [62–66].

Cependant, l'incidence de la kératite fongique, documentée pour la première fois en 1879, augmente progressivement depuis les 30 dernières années. Selon les études, elle représente actuellement environ 40 à 50 % de tous les cas de kératites infectieuses. Il a été montré que la prévalence des kératites fongiques était souvent associée à la localisation géographique. Les variations observées peuvent même apparaître au sein d'un même pays selon la région étudiée [67]. Les zones à climat humide et à forte activité agricole présentent un taux de prévalence allant de 20 à 60 % [68]. La kératite fongique peut être due à un champignon levuriforme, majoritairement retrouvé dans les régions tempérées, ou à un filamenteux, comme *Aspergillus* spp. ou *Fusarium* spp. [69].

Le genre *Fusarium* est le principal agent fongique retrouvé dans ce type d'infection, avec une prévalence de 40 à 88,5 % des cas [60]. De plus, l'identification morphologique et moléculaire a rapporté qu'il s'agissait majoritairement d'espèces appartenant au complexe d'espèces *Fusarium solani* [60]. Un des facteurs de risque majeur de la kératite microbienne est une utilisation inadaptée et un mauvais entretien des lentilles de contact, comme le port de celles-ci pendant la nuit ou leur lavage avec de l'eau du robinet. Entre 2005 et 2006, une importante épidémie de kératites à *Fusarium* est apparue aux États-Unis et à travers le monde. L'origine de l'infection a été attribuée à un défaut de stabilité d'une solution désinfectante pour lentilles de contact [70,71].

La cornée, organe avasculaire, joue un rôle de barrière et présente un système de défense immunitaire restreint. Ainsi, la colonisation fongique est facilitée, car les champignons sécrètent diverses molécules et enzymes favorisant l'invasion et la croissance fongique au niveau de la cornée [72]. La kératite fongique correspond à l'infiltration du champignon dans le stroma cornéen suite à une perte d'intégrité de l'épithélium cornéen (traumatisme, corps étranger, ...). Une fois dans le tissu, le champignon se développe de manière circonférentielle avec des lésions satellites (Figure 10). Par la suite, il pénètre plus profondément le stroma pour atteindre au final la chambre antérieure. Les premiers symptômes apparaissent généralement plusieurs heures voire jours après le contact avec *Fusarium* (traumatisme avec matériel végétal ou lentille de contact souillée). La progression de l'infection peut être rapide et entraîner une perforation de la cornée et une endophtalmie, *a fortiori* en présence de corticoïdes (Figure 11) [69,73–75].



Figure 10 : Kératite à *Fusarium oxysporum* (présence d'un infiltrat blanc opaque avec une marge trouble) chez un patient de 57 ans, porteur de lentilles de contact (d'après Szaliński *et al.* 2021 [75])

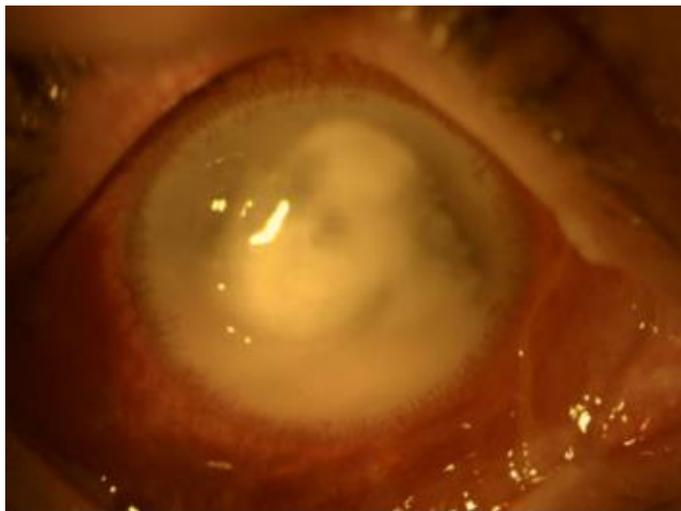


Figure 11 : Kératite sévère à *Fusarium* spp., suite à une mauvaise utilisation des lentilles de contact et à un traitement initial prolongé et inadéquat (d'après Szaliński *et al.* 2021 [75])

### 4.3. Mycétomes

Les mycétomes sont des infections sous-cutanées chroniques qui peuvent être dues à des champignons (eumycétomes) ou des bactéries du genre Actinomycètes (actinomycétomes). Elles sont principalement retrouvées dans les régions tropicales et arides. Elles font partie des maladies tropicales oubliées [76]. Selon une revue et méta-analyse de 2013, les pays à forte prévalence sont la Mauritanie (3,49 cas pour 100 000 habitants) et le Soudan (1,81 cas pour 100 000 habitants). De manière générale, les actinomycétomes sont plus fréquents (51-60 % des cas) que les mycétomes fongiques, bien que la répartition varie selon la région géographique étudiée [76,77]. Nenoff *et al.* ont recensé 25 agents fongiques identifiés comme étant responsables d'eumycétomes, dont le genre *Fusarium* [78].

Les mycétomes à *Fusarium* sont très minoritaires, une étude a rapporté seulement 20 cas publiés entre 1964 et 2016 [79]. Cependant, l'épidémiologie des mycétomes fongiques est mal connue et la prévalence certainement sous-estimée. En effet, la pathologie est vraisemblablement sous-déclarée dans les milieux ruraux des régions tropicales.

Touchant les populations rurales des régions à faible revenu, la principale atteinte est le pied, mais elle peut s'étendre à la partie osseuse entraînant des complications [80,81]. Après

inoculation du champignon suite à un traumatisme (épine, plaie...), l'infection fongique sous-cutanée se développe et évolue lentement pendant des mois ou des années. La forme de développement du champignon *in vivo* au sein du tissu est appelé grain. Il s'agit d'éléments fongiques au niveau du tissu adipeux sous-cutané. Ils forment des conglomérats denses d'hyphes enfermés dans une substance matricielle. Visibles au microscope optique, voire à l'œil nu, ils peuvent mesurer entre 0,3 et 1 mm de diamètre. La couleur des grains varie en fonction de l'espèce en cause. Elle peut être noire, rouge, jaune ou blanche (pâle), comme c'est le cas des grains dus à *Fusarium* spp. [78,79].

L'aspect typique du mycétome correspond à une tuméfaction unilatérale avec des fistules contenant plus ou moins de grains (Figure 12). La tuméfaction est un gonflement indolore du tissu sous-cutané. Au stade tardif de l'infection, des déformations sont observées avec un élargissement des extrémités du pied, historiquement appelé « pied de Madura » (Figure 13), entraînant des douleurs et un handicap à la marche. La distinction entre mycétome fongique et actinomycétome est pratiquement impossible sur leurs aspects cliniques. Il n'a pas été rapporté de terrain immunodéprimé favorisant la survenue de l'eumycétome [76].



Figure 12 : Eumycétome à *Fusarium solani* var *keratoplasticum* présentant de multiples nodules sous-cutanés avec écoulements de grains (d'après Correia *et al.*, 2022 [82])



Figure 13 : Mycétome du pied à grains noirs (stade de « pied de Madura ») (d'après Develoux, 2016 [76])

#### **4.4. Infections cutanées**

Le genre *Fusarium* est également impliqué dans des infections cutanées autres que les mycétomes. Les formes cliniques peuvent être variables. Ces lésions cutanées d'aspects très variables peuvent être pustuleuses et entraîner des ulcères purulents voire des nécroses (Figure 14). Selon le terrain immunitaire, il a été décrit une invasion vasculaire avec des images de type vasculites. L'atteinte cutanée ou sous cutanée donne lieu à des nodules avec des granulomes ou des inflammations de type panniculite. Il est important de distinguer ces lésions, issues de sites primaires d'infection, de métastases cutanées observées dans les formes disséminées [83,84]. Bien qu'observables chez les patients immunocompétents, les fusarioses cutanées touchent principalement des patients à risques, comme ceux présentant une hémopathie, les transplantés, les brûlés et les diabétiques [85–87]. L'atteinte cutanée est connue pour être une des principales portes d'entrée de *Fusarium* dans les cas d'infections fongiques invasives soit 70 % des cas selon l'étude de Nucci *et al.* [85].

La présence de lésions multiples est plus en faveur d'une dissémination fongique par voie sanguine, surtout chez les patients à risque. Il peut s'agir des premières manifestations cliniques tangibles d'une infection septique à *Fusarium* [83,85].



Figure 14 : Lésions ulcéreuses à *Fusarium* sp. au niveau de la face antérieure de la jambe gauche (d'après Pérez-Pérez *et al.*, 2007 [87])

## 4.5. Sinusites

La sinusite est l'une des pathologies humaines la plus courante dans le milieu médical à travers le monde. L'étiologie repose sur un ensemble de facteurs liés à l'hôte et de facteurs environnementaux. L'agent pathogène est principalement viral pour la sinusite aiguë, mais il peut s'agir de bactéries ou de champignons [88]. L'incidence des sinusites fongiques varie entre 2 et 7 % ; cette atteinte est majoritairement décrite chez les personnes immunodéprimées et l'agent fongique en cause le plus fréquent est le champignon du genre *Aspergillus* [89].

Selon le degré d'invasion des sinus, la sinusite fongique sera dite non invasive ou invasive. La sinusite fongique non invasive est principalement décrite chez les individus immunocompétents. A l'inverse, la sinusite invasive est plus fréquente en cas d'immunodéficience. Du fait de sa localisation, l'infection peut se propager dans l'espace intracérébral, augmentant la morbidité et la mortalité des patients infectés [90,91]. La contamination se fait par l'inhalation de conidies ou spores de champignons présentes dans l'air. La colonisation fongique des sinus n'est donc pas rare et n'entraîne pas systématiquement une infection, les champignons étant omniprésents dans l'environnement. Le système

immunitaire joue un rôle important dans la pathogénicité des micromycètes environnementaux. Les facteurs de risque sont le diabète, l'immunodépression induite ou non par des molécules thérapeutiques (immunosuppresseurs, corticostéroïdes, ...) [92].

Les principaux agents responsables de 90 à 95 % des cas de sinusite fongique sont le genre *Aspergillus* et les mucorales [93,94]. Dans une moindre mesure, le genre *Fusarium* a également été décrit comme responsable de sinusites fongiques allergiques, non invasives, et invasives surtout chez les patients immunodéprimés. Les manifestations cliniques ne se distinguent pas des autres sinusites fongiques invasives, comme celles causées par *Aspergillus*. Il est caractéristique d'observer une nécrose de la muqueuse due à l'angioinvasion par le champignon. Dans un contexte d'immunodépression, *Fusarium* est capable d'atteindre plus facilement les muqueuses et d'envahir les structures orbitales et intracrâniennes par dissémination hématogène [95].

## 4.6. Fusarioses invasives

Les cas d'infections fongiques invasives à *Fusarium* sont dits fusarioses. En dehors de l'Australie, la fusariose est la deuxième infection à moisissures la plus fréquente chez l'Homme après l'aspergillose [96]. Jusque dans les années 1980, le genre *Fusarium* était principalement incriminé dans des atteintes superficielles, comme les kératites et les onychomycoses, ou plus rarement dans des infections invasives localisées. Cependant les infections profondes à *Fusarium*. chez l'Homme ont vu leur nombre augmenter depuis les quatre dernières décennies [2,54,97].

Les infections invasives sont systémiques et peuvent entraîner également des atteintes au niveau cutané, cérébral, pulmonaire, oculaire et osseux [97–99]. Elles touchent principalement les patients immunodéficients, tels que ceux souffrant de neutropénie sévère et prolongée, en particulier lors d'hémopathies malignes et les receveurs de greffes de cellules hématopoïétiques. L'étude de Nucci *et al.* a montré que 92 % des fusarioses étaient associées à une hémopathie, dont la leucémie aiguë représentant 58 % de celles-ci, suivi par les cas post-allogreffes de cellules hématopoïétiques (38 %) [36,100–103].

Selon les études, le complexe d'espèces *Fusarium solani* représente 50 à 60 % des infections systémiques à *Fusarium*, suivi par le complexe d'espèces *Fusarium oxysporum* (20 %) [2,36]. Comme pour l'aspergillose pulmonaire invasive, la principale porte d'entrée des fusarioses disséminées est l'inhalation de microconidies en suspension dans l'air. Ces données sont confirmées par le fait que les sites anatomiques principalement touchés sont les sinus et les poumons [104]. Des études ont montré que l'onychomycose ainsi que l'infection cutanée via une brèche de l'épiderme seraient impliquées et à l'origine de cas de fusarioses invasives [54,86,96,105].

L'infection disséminée est la manifestation la plus courante d'une fusariose invasive. Elle fait généralement suite à une fongémie. Cette dernière est fréquente, car le genre *Fusarium* a la capacité de produire des structures ressemblant à des levures, appelées aleuroconidies. La taille et la forme de ces éléments favorisent l'envahissement et la dissémination du champignon par la circulation sanguine [36]. Les patients présentent une fièvre persistante réfractaire aux antibiotiques et aux antifongiques, associée à des lésions cutanées métastatiques, une pneumonie, une sinusite et parfois une endophtalmie (Figure 15 et Figure 16). Les lésions cutanées sont fréquentes dans la fusariose invasive et retrouvées chez 72 % des patients immunodéprimés atteints de fusariose invasive selon l'étude de Nucci *et al.* [85]. Ces lésions pouvant être précoces, la peau est souvent le premier point d'appel voire dans certains cas la seule source de diagnostic de l'infection [104,106].

L'atteinte pulmonaire est caractérisée par des douleurs thoraciques, une toux et des hémoptysies. Chez les patients à risque, la physiopathologie de la pneumopathie à *Fusarium* est similaire à celle de l'aspergillose invasive, ne permettant pas de distinguer cliniquement les deux pathologies. Cependant, l'atteinte pulmonaire à *Fusarium* est souvent ultérieure à une dissémination hématogène, avec des manifestations cutanées et la présence d'hémocultures positives [104,107].



Figure 15 : Lésions cutanées à *F. solani* chez une patiente atteinte de leucémie aiguë lymphoblastique (d'après Yu *et al.*, 2019 [108])



Figure 16 : Nodules cutanés à *Fusarium*, chez un patient greffé de cellules souches hématopoïétiques (d'après Nucci *et al.*, 2015 [109])

Le pronostic de la fusariose invasive chez les patients immunodéprimés est très sombre, avec des taux de survie à 90 jours entre 13 et 21 % [101,110]. Cependant, une étude de 2015 a montré une amélioration du taux de survie avec une augmentation de 21 points (22 % versus 43 %), en minimisant et/ou réduisant la période d'immunosuppression. Il a été montré que le pronostic était dépendant des facteurs liés à l'hôte, comme la durée de la neutropénie et l'utilisation de corticostéroïdes [102].

## 5. DIAGNOSTIC EN CLINIQUE

En raison de l'absence de caractères discriminants forts et de biomarqueurs spécifiques, le diagnostic clinique de la fusariose, pourtant essentiel, est souvent difficile. Il repose principalement sur le diagnostic direct et la mise en évidence de *Fusarium*. En fonction de la localisation de la fusariose, les échantillons biologiques utiles pour le diagnostic peuvent être des fragments et poudres d'ongles dans les onychomycoses, des produits de grattage cornéen dans le cas de kératites, des biopsies tissulaires dans les localisations cutanées ou profondes, voire des hémocultures dans le cas des fusarioses disséminées.

### 5.1. Examen direct

L'observation microscopique du prélèvement est réalisée afin de rechercher des éléments fongiques. Elle peut être mycologique grâce à des colorants spécifiques pour les champignons tels que le noir de chlorazol ou le calcofluor white. L'examen direct peut également être anatomopathologique avec l'utilisation de colorations comme l'HE (hématoxyline éosine), le PAS (perodic acid Schiff), ou le Grocott (Figure 17) [111].

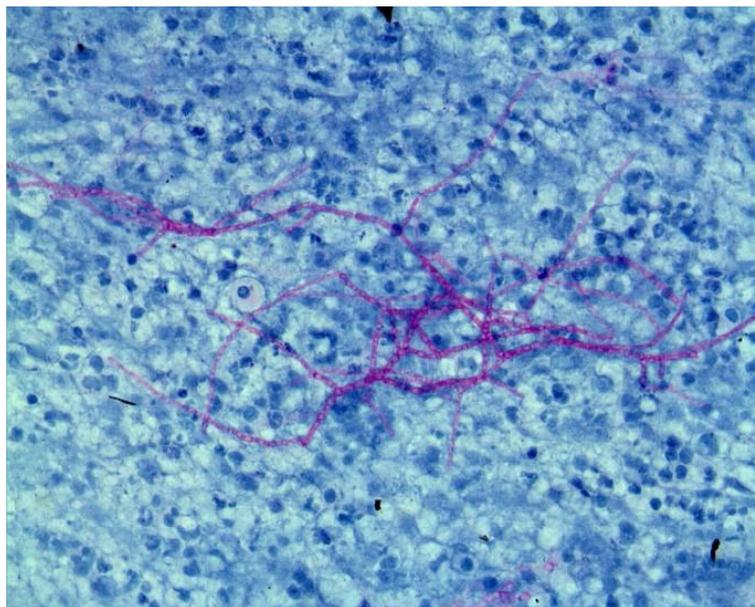


Figure 17 : Hyphes de *Fusarium solani* à la coloration acide périodique de Schiff (d'après Banerji et Singh J, 2011 [111])

Lorsqu'il est positif, l'examen direct montre des filaments mycéliens septés similaires à ceux du genre *Aspergillus*. Ce dernier et le genre *Fusarium* présentent des filamenteux hyalins, septés et ramifiés. Une différence de ramification peut être observée entre le genre *Aspergillus* (ramification dichotomique) et *Fusarium* (ramification aléatoire). Cependant, cette particularité est très difficile à identifier dans les coupes de tissus (Figure 18) [112]. Le diagnostic formel du genre fongique à l'étape de l'examen direct peut être réalisé à l'aide d'anticorps monoclonaux spécifiques, mais rarement utilisés en anatomopathologie de routine [113].

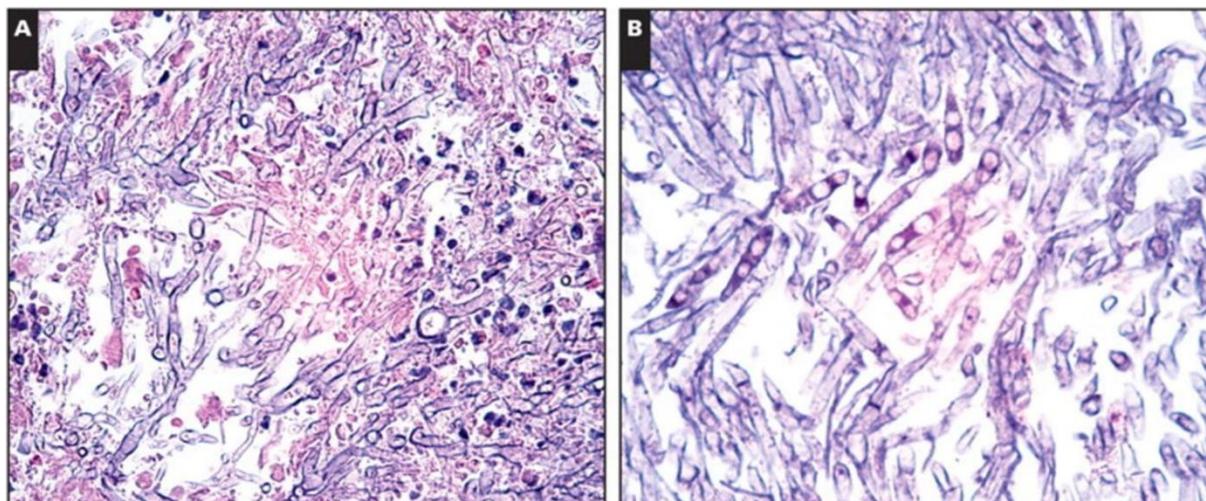


Figure 18 : A-Hyphes fongiques d'*Aspergillus fumigatus* confirmés par culture (coloration HE) ; B-Hyphes fongiques de *Fusarium* sp. (coloration HE) (d'après Montone, 2009 [112])

L'examen direct est un élément important et essentiel du diagnostic, malgré le manque de sensibilité et spécificité. Tout examen direct est associé à une culture.

## 5.2. Culture

La culture consiste en un ensemencement du prélèvement du patient sur un ou des milieux de culture. L'utilisation de milieux contenant des antibiotiques (Sabouraud avec

chloramphénicol plus ou moins gentamicine) limite la prolifération bactérienne et favorise l'isolement des colonies fongiques pour les prélèvements plurimicrobiens [114]. Pour les prélèvements à visée diagnostique d'une fusariose disséminée, l'utilisation de flacons d'hémocultures est à privilégier, car ils permettent de réduire le délai de croissance [115]. Sur milieu classique de mycologie (milieu de Sabouraud par exemple), le genre *Fusarium* présente une croissance fongique en 48 à 72 heures à 37°C.

Le résultat de la culture doit toutefois être interprétée en fonction du contexte clinique. En effet, le genre *Fusarium* reste encore un contaminant de laboratoire. De même que la colonisation de l'arbre respiratoire, la possibilité d'une contamination aérienne des prélèvements doit toujours être évoquée. Les éléments en faveur d'une infection sont un examen direct positif sur matériel biologique associé à une culture positive. Néanmoins, en l'absence d'examen direct positif, l'isolement de plusieurs colonies sur un prélèvement ou la répétition de cultures positives à *Fusarium* à partir d'un ou de plusieurs sites anatomiques doivent être interprétés et considérés comme marqueurs de fusariose, surtout chez les patients à risque, notamment ceux atteints d'hémopathie [36].

### **5.3. Immunodiagnostic**

La surveillance des patients à risque de développer des mycoses invasives est primordiale. Le développement des techniques d'immunodiagnostic a permis l'utilisation d'analyses peu invasives réalisées sur un simple prélèvement veineux. Les biomarqueurs tels que le bêta-D-glucane ou le galactomannane sont une aide précieuse au diagnostic pour les infections fongiques invasives telles que les candidoses ou les aspergilloses. Cependant, aucune recommandation n'existe à ce jour sur l'utilisation de biomarqueurs spécifiques de la détection de *Fusarium* [114]. Une étude rétrospective de 2020 sur des fusarioses invasives a montré que le galactomannane et le bêta-D-glucane étaient positifs dans respectivement 37,5 et 100 % des cas [116].

L'antigène galactomannane est un polysaccharide libéré par certains champignons lors de leur croissance. La détection d'antigène galactomannane sérique, mise au point pour le diagnostic des aspergilloses pulmonaires invasives, peut également présenter une réaction croisée avec les

infections à *Fusarium* [117]. Les deux genres fongiques présentent une structure de paroi cellulaire similaire. Ainsi, ce biomarqueur pourrait être un indicateur de fusariose disséminée. Dans une étude de 18 cas et témoins, la détection de galactomannane pour le diagnostic de fusariose présente une sensibilité de 83 % et une spécificité de 67 % [118].

L'autre biomarqueur utilisé dans le diagnostic des IFI est le 1,3-bêta-D-glucane, constituant ubiquiste des parois fongiques à l'exception du genre *Cryptococcus* et des Zygomycètes. Libéré dans le sang, il peut ainsi être détecté en cas d'infections à *Aspergillus*, *Candida*, et à *Fusarium*. Ce test fait partie des critères biologiques de l'EORTC (European Organisation for Research and Treatment of Cancer) [119]. Cependant, le nombre important de situations engendrant des faux positifs lui confère une valeur prédictive positive relativement faible (bactériémie, traitement par amoxicilline, nutrition parentérale, ...) [120]. Dans une étude rétrospective, l'utilisation de 2 tests consécutifs a montré une sensibilité, une spécificité et des valeurs prédictives positives et négatives respectivement de 85 %, 69 %, 7 % et 99 %. Le 1,3-bêta-D-glucane était généralement positif avant le diagnostic, mais la faible valeur prédictive positive limite son utilisation [121].

Une étude a montré également qu'un autre test immunoenzymatique dirigé contre les mannanes (antigènes du genre *Candida*) présentait des réactions croisées avec le genre *Fusarium*, plus particulièrement *F. verticillioides*. Aucune réaction n'a pu être observée chez le complexe d'espèces *Fusarium solani* [122].

## 5.4. Identification phénotypique

L'examen des caractères macroscopiques et microscopiques des colonies de champignons permet l'identification de première intention. Le diagnostic de genre repose principalement sur la présence de macroconidies incurvées, hyalines et multicellulaires [11]. Cependant, le diagnostic du complexe d'espèces est plus compliqué et requiert une expertise particulière, les différences culturelles étant parfois subtiles et inconstamment présentes selon le milieu de culture utilisé.

L'identification précise du complexe d'espèces est indispensable en clinique. En plus de l'aspect épidémiologique pour connaître le spectre des espèces responsables d'infections, le

diagnostic du complexe d'espèces est essentiel pour la prise en charge du patient afin d'adapter les stratégies thérapeutiques en fonction des profils de résistance de chacune des espèces.

Une proposition de clé d'identification des espèces du genre *Fusarium* est présente dans Atlas of Clinical Fungi (Tableau 2) [11].

Tableau 2 : Algorithme d'identification phénotypique des *Fusarium* (d'après de Hoog GS, *et al.* 2020 [11])

<b>1.a</b>	Colonies de moins de 2 cm de diamètre en 7 à 10 jours ; macroconidies avec 1 à 2 septa	→ 2
<b>1.b</b>	Colonies de plus de 2 cm de diamètre, habituellement 4 à 8 cm en 7 à 10 jours	→ 5
<b>2.a</b>	Macroconidies de plus de 55 µm de long ; chlamydospores absentes	<i>Fusarium aquaeductuum</i>
<b>2.b</b>	Macroconidies courtes généralement moins de 25 µm de long ; chlamydospores absentes ou présentes	→ 3
<b>3.a</b>	Macroconidies très incurvées avec une pointe à l'apex ; chlamydospores présentes	→ 4
<b>3.b</b>	Macroconidies légèrement incurvées avec une faible pointe à l'apex ; chlamydospores absentes	<i>Plectosporium tabacinum</i>
<b>4.a</b>	Cellules conidiogènes longues, étroites, souvent septées	<i>Fusarium falciforme</i>
<b>4.b</b>	Cellules conidiogènes courtes, gonflées, unicellulaires	<i>Fusarium dimerum</i>
<b>5.a</b>	Microconidies rares ou absentes ; colonies ocrées à brunes ; cellules conidiogènes polyblastiques abondantes	<i>Fusarium incarnatum</i>
<b>5.b</b>	Microconidies nombreuses	→ 6
<b>6.a</b>	Microconidies en chaînes	→ 7
<b>6.b</b>	Microconidies non en chaînes	→ 10
<b>7.a</b>	Microconidies uniquement portées sur des monophialides	→ 8

<b>7.b</b>	Microconidies portées sur des monophialides ou des polyphialides	→ 9
<b>8.a</b>	Microconidies napiformes ou en forme de citrons présentes	<i>Fusarium napiforme</i>
<b>8.b</b>	Microconidies napiformes ou en forme de citrons absentes	<i>Fusarium verticilloides</i>
<b>9.a</b>	Chlamydo-spores absentes	<i>Fusarium proliferatum</i>
<b>9.b</b>	Chlamydo-spores abondantes	<i>Fusarium nygamai</i>
<b>10.a</b>	Cellules conidiogènes polyblastiques fréquentes	→ 11
<b>10.b</b>	Cellules conidiogènes polyblastiques absentes	→ 14
<b>11.a</b>	Colonies rouges ; chlamydo-spores abondantes ; blastoconidies prédominantes	<i>Fusarium chlamydo-sporum</i>
<b>11.b</b>	Colonies roses-violettes ; chlamydo-spores absentes ; blastoconidies moins abondantes	→ 12
<b>12.a</b>	Microconidies produites par un conidiophore prolongé sur les hyphes poussant horizontalement à la surface de la gélose, généralement non septé, obovale avec une extrémité plus étroite ellipsoïdale	<i>Fusarium sacchari</i>
<b>12.b</b>	Microconidies produites par un conidiophore érigé	→ 13
<b>13.a</b>	Microconidies pyriformes présentes	<i>Fusarium anthophilum</i>
<b>13.b</b>	Microconidies pyriformes absentes	<i>Fusarium subglutinans</i>
<b>14.a</b>	Microconidies sur des monophialides courtes souvent latérales ; macroconidies orange en masses, sans cellule de « pied » distinctes ; colonies blanches à violettes, ou ocres à oranges lorsque les sporodochia sont présentes	<i>Fusarium oxysporum</i>
<b>14.b</b>	Microconidies sur des monophialides longues ; macroconidies avec cellules de « pied » indistinctes ; colonies blanches crèmes ou bleues à bleues-vertes lorsque les sporodochia sont présentes	<i>Fusarium solani</i>

En suivant cet algorithme, la clé d'identification de *Fusarium solani* suit le schéma suivant : 1.b → 5.b → 6.b → 10.b → 14.b. Les caractéristiques morphologiques sont présentées par la Figure 19.

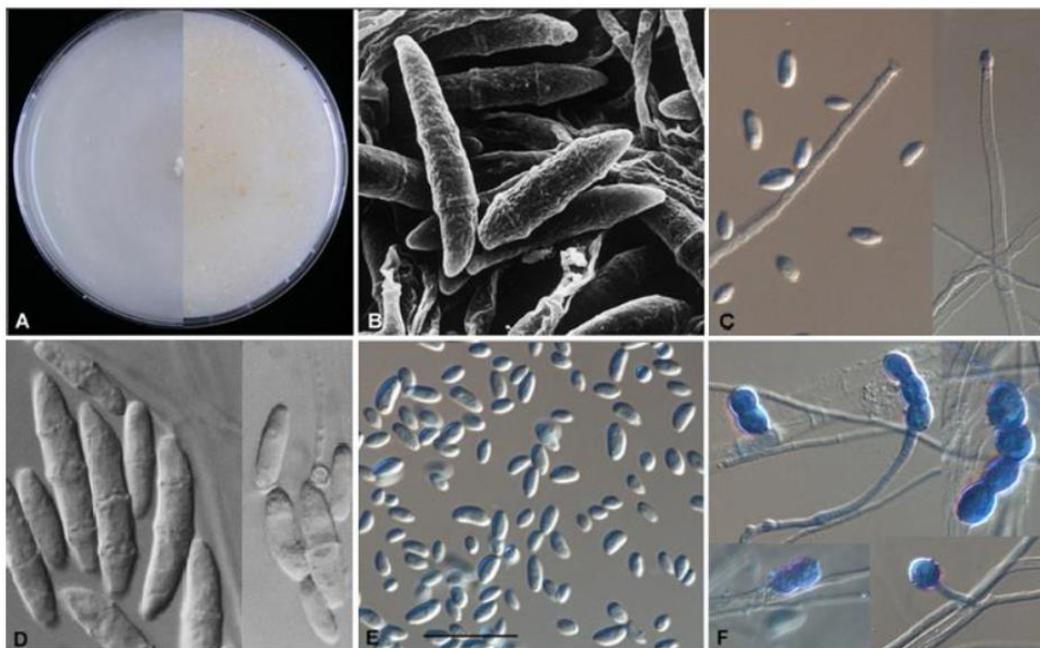


Figure 19 : Caractéristiques macroscopiques (A) et microscopiques de *F. solani* (B, D : macroconidies, C : monophialides, E : microconidies, F : chlamydospores) (d'après de Hoog GS, *et al.* 2020 [11])

## 5.5. Spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time Of Flight) est une technique d'identification rapide, simple et peu coûteuse. Ces dernières années, elle est devenue un outil de premier plan pour l'identification des micro-organismes, y compris des champignons pathogènes. Réalisable après culture, elle nécessite une co-cristallisation de l'agent biologique à identifier avec une matrice. Un laser vient irradier le complexe entraînant une ionisation en phase gazeuse des molécules constituant l'échantillon. Les ions formés sont accélérés et vont transiter dans un tube de « vol » sous vide. Ils seront séparés en fonction de leur vitesse et donc caractérisés par un rapport masse/charge ( $m/z$ ). La détection des ions permet d'obtenir un spectre qui sera comparé à une base de données (Figure 20) [123,124]. Ainsi pour l'identification d'espèces fongiques, une base de données robuste et exhaustive est indispensable pour une identification correcte.

L'identification par spectrométrie de masse a été appliquée aux 9 principaux complexes d'espèces de *Fusarium* responsables d'infections chez l'Homme en comparant avec l'identification obtenue après séquençage du locus TEF, analyse la plus discriminante à l'heure actuelle [125]. Une base de données des spectres a été créée. Le principal avantage de cette méthode est le délai court d'obtention du résultat, avec l'identification d'une souche en moins d'une heure [126].

En 2017, une base de données en ligne ouverte et gratuite a vu le jour pour l'identification des agents fongiques, la Mass Spectrometer Identification database (MSI), utilisée actuellement par plus de 200 laboratoires dans le monde [127]. Actuellement, la base MSI et les bases de données mises à disposition pour les fournisseurs de technologie MALDI-TOF permettent une identification de certaines espèces au sein même du complexe.

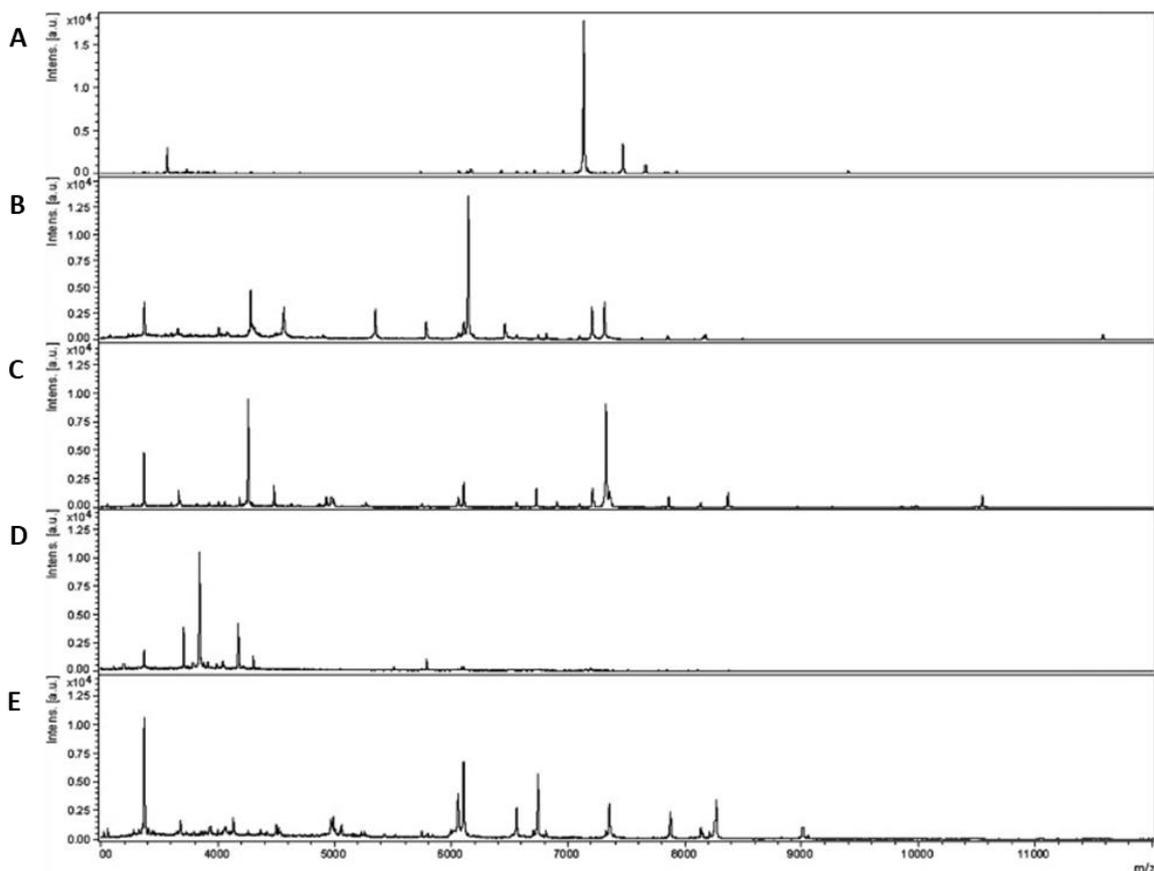


Figure 20 : Spectres de masse MALDI-TOF des différentes souches de *Fusarium* (d'après Marinach-Patrice *et al.*, 2009 [126])

(**A** : *Fusarium dimerum* ; **B** : *Fusarium oxysporum* ; **C** : *Fusarium proliferatum* ; **D** : *Fusarium solani* ; **E** : *Fusarium verticillioides*)

## 5.6. Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire se sont très rapidement développées et imposées dans le quotidien des laboratoires suite à la découverte de la PCR dans les années 1980. En biologie médicale, il est possible de réaliser de la biologie moléculaire soit directement sur un prélèvement soit après mise en culture de celui-ci. Cette deuxième option permet d'isoler un micro-organisme en vue de son identification. Il a été démontré que la biologie moléculaire pouvait être un atout majeur dans la prise en charge des infections fongiques invasives. En effet, le délai de diagnostic et par conséquent l'instauration d'une thérapeutique adaptée conditionnent l'évolution et le pronostic de la pathologie [128]. En diagnostic moléculaire fongique, la cible la plus utilisée actuellement est le gène codant la région ITS (Internal Transcribed Spacer)[129].

Appliquées au genre *Fusarium*, les techniques de biologie moléculaire utilisant les régions ITS ne sont pas suffisamment discriminantes. En effet, la région ITS est trop conservée et la détection par ces loci sous-estime le polymorphisme et la diversité d'espèces phylogéniques [130]. Plusieurs études se sont intéressées aux gènes alternatifs permettant la distinction inter-espèces de *Fusarium*. Ainsi, le gène EF1 $\alpha$  (translation elongation factor 1 alpha) est apparu comme un marqueur de choix d'identification. Il s'agit d'un locus monocopie, doté d'un haut niveau de polymorphisme [131–133]. L'équipe de O'Donnell a proposé un schéma d'identification se basant sur le séquençage non pas d'un locus mais de 3 loci : EF1 $\alpha$ , RPB1 (largest subunit of RNA polymerase) et RPB2 (second largest subunit of RNA polymerase) [130,134,135].

Dans le cas du diagnostic de fusariose invasive, le schéma proposé par O'Donnell peut s'avérer difficilement applicable d'un point de vue économique mais également technique avec un long délai de rendu de résultat. Une étude récente a proposé des stratégies d'identification alliant performance analytique et efficacité technique. Ainsi, pour l'identification d'une culture fongique appartenant au genre *Fusarium*, les auteurs recommandent de réaliser un séquençage du gène EF1 $\alpha$ , qui sera ensuite analysé à partir de la base de données spécifique *Fusarium* MLST. Dans le cas d'un prélèvement primaire avec suspicion de fusariose (biopsie cutanée, prélèvement ophtalmologique dans le cas d'une kératite), la réalisation d'une PCR pan-fongique

(ITS) peut être suffisante. En effet, l'analyse de la séquence obtenue avec cette même base de données améliore les performances d'identification et peut permettre un diagnostic du complexe d'espèces [125].

L'identification d'une souche de *Fusarium* peut être réalisée par le séquençage d'un des trois loci cités précédemment. Puis la détermination de l'espèce phylogénique au sein du complexe sera réalisée par une identification multilocus. D'autres schémas de typage par séquençage MLST (Multilocus Sequence Typing) ont été proposés et comparés entre eux [136,137]. En augmentant les données phylogénétiques informatives supplémentaires par de nouveaux loci, il serait possible de mettre en évidence des espèces cryptiques insoupçonnées pour le complexe d'espèces *Fusarium solani* [138].

Récemment, une PCR quantitative (qPCR) ciblant un locus conservé au niveau du gène *ADNr 28S* codant l'ARN ribosomal 28S a été publié par Dellière *et al.* [139]. Capable de détecter l'ADN de *Fusarium* spp. dans le cadre du diagnostic précoce d'une infection invasive, elle permet d'identifier la majorité des complexes d'espèces de *Fusarium* à partir d'un prélèvement sanguin. L'analyse présente une sensibilité de 93 % et permet la détection d'ADN circulant jusqu'à 18 jours, avec une médiane à 6 jours, avant que le diagnostic ne soit confirmé par une hémoculture ou une biopsie positive. La qPCR n'a montré aucune réaction croisée avec d'autres champignons opportunistes. Cette analyse faciliterait le diagnostic précoce de la fusariose invasive chez les populations à risque, mais également serait un marqueur pronostique. En effet, l'étude montre que des charges fongiques élevées associées ou non à une détection persistante sont liées à un mauvais pronostic.

## 6. TRAITEMENT ET ANTIFONGIQUES

### 6.1. Profil de sensibilité

Le genre *Fusarium* est résistant *in vitro* à la majorité des antifongiques utilisés en clinique humaine, comme la flucytosine, les triazolés de première génération (fluconazole, itraconazole) et aux échinocandines [114,140,141]. Les molécules les plus actives sur *Fusarium* sont l'amphotéricine B et le voriconazole. En général, les CMI sont plus élevées pour le voriconazole que pour l'amphotéricine B (4-8 µg/mL pour le voriconazole et 0,5-1 µg/mL pour l'amphotéricine B). Ces deux molécules pourraient être classées en « intermédiaires » voire « résistantes » en se référant aux valeurs seuils d'*Aspergillus fumigatus* définies par le Comité européen des tests de sensibilité aux antimicrobiens (EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing).

A l'heure actuelle, le genre *Fusarium* ne bénéficie pas de bornes permettant une interprétation de profil de sensibilité. Cependant, il existe une grande variabilité dans les CMI obtenues en fonction des complexes d'espèces. En effet, le complexe d'espèces *Fusarium solani* (FSSC) est décrit comme le moins sensible [104]. Une étude multicentrique de 2016 a testé 1150 isolats appartenant à différents complexes d'espèces de *Fusarium* vis-à-vis de divers antifongiques. Pour les FSSC (608 isolats), les valeurs de CMI étaient de  $\leq 0,25$  à 16 µg/mL pour l'amphotéricine B, 0,5 à  $> 16$  µg/mL pour le voriconazole. Ces données ont permis de proposer des ECOFFs, ECVs (epidemiological cut-off values) ou valeurs limites épidémiologiques pour le complexe FSSC, mais également pour d'autres complexes. Elles sont déterminés uniquement sur la base de la distribution des CMI et définis comme la valeur de CMI la plus élevée pour les isolats de type sauvage, soit sans mécanismes de résistance acquise et mutationnelle phénotypiquement détectables) [142,143].

Tableau 3 : Distribution des CMI de différents antifongiques pour les complexes FOSC et FSSC, déterminées par la méthode de microdilution CLSI (d'après Espinel-Ingroff *et al.*, 2016 [142])

(CMI : concentration minimale inhibitrice ; AMB : amphotéricine B; ITR : itraconazole; POS : posaconazole; VOR : voriconazole).

Complexe d'espèces	Antifongique	CMI (µg/ml)		Valeurs limites épidémiologiques estimées		
		Etendue de valeur	Valeur la plus fréquente	≥95 %	≥97,5 %	≥99 %
<i>Fusarium oxysporum</i>	AMB	≤0.25–16	2	4	8	8
	ITR	1–≥16	16	32	32	32
	POS	0.5–16	2	8	8	8
	VOR	0.5–≥16	4	8	16	16
<i>Fusarium solani</i>	AMB	≤0.25–16	2	4	8	8
	ITR	0.5–≥16	16	16	32	32
	POS	1–≥16	8	32	32	32
	VOR	0.5–≥16	8	16	32	32

L'isavuconazole, nouvel antifongique azolé, montre également des CMI hautes et variables selon les espèces. Une première étude a testé cette molécule sur 14 isolats d'espèces de *Fusarium*, dont FSSC. La CMI<sub>50</sub> était supérieure à 4 µg/mL avec un intervalle de 2 à >8 µg/mL. Dans une seconde étude, 75 isolats cliniques dont 22 isolats FSSC ont été évalués. La CMI<sub>50</sub> était supérieure à 16 µg/mL avec un intervalle de 4 à > 16 µg/mL pour FSSC [144,145].

Les deux nouvelles molécules antifongiques, olorofim et fosmanogepix, ont également été testées sur le genre *Fusarium*. L'olorofim est un composé appartenant à la classe des orotomides. Sur les 16 isolats de FSSC évalués, il en est ressorti une CMI<sub>50</sub> supérieure à 4 µg/mL (intervalle de 1 à > 4 µg/mL). L'autre molécule, le fosmanogepix, quant à lui, a présenté des valeurs de CMI allant de ≤ 0,015 à 0,25 µg/mL [146,147].

Dans un modèle murin *in vivo* de fusariose invasive, aucune corrélation entre la survie et la CMI n'a été observée [148]. D'autres études cliniques ont également montré qu'il n'existait pas de corrélation entre CMI et évolution clinique. En effet, les CMI<sub>50</sub> des souches isolées chez les patients ayant survécu et traités par voriconazole en monothérapie et celles de ceux décédés étaient respectivement de 4 µg/mL et de 8 µg/mL (p = 0,68). Les mêmes résultats ont été obtenus pour l'amphotéricine B seule ou en association avec le voriconazole [149]. Par ailleurs, l'équipe de Nucci en 2014 avait montré des taux de réponse au traitement similaires entre le voriconazole et l'amphotéricine B, et ce malgré des valeurs de CMI plus élevées pour le voriconazole [102]. L'ensemble des données de la littérature suggère que, dans le cas de la fusariose invasive, les résultats des antifongigrammes *in vitro* ne doivent pas être utilisés pour

guider le choix du traitement. Par conséquent, les tests de sensibilité aux antifongiques seraient plus utilisables à visée épidémiologique, et non pour définir le traitement primaire de la fusariose invasive [104].

## 6.2. Recommandations et stratégies thérapeutiques

### 6.2.1. Onychomycoses

Les options de traitement sont limitées et les échecs thérapeutiques sont fréquents. Les facteurs favorisant ces échecs et/ou réinfections sont la prédisposition génétique, un diagnostic incorrect (moisissure non dermatophyte, infection mixte), les comorbidités (diabète, VIH,...), la résistance aux antifongiques, ou la mauvaise compliance du patient en raison de la durée longue de traitement [150–153]. Il a été montré que les antifongiques systémiques présentaient la plus grande efficacité. Par ailleurs, l'association à des agents topiques permet également d'améliorer les chances de guérison. Le taux de guérison par traitement systémique comme la terbinafine ou l'itraconazole était respectivement de 76 % et 63 %. Les traitements topiques présentaient quant à eux des taux de guérison plus faibles, comme l'éfinaconazole avec 55 % ou le ciclopirox avec 36 % [154].

Très peu d'études se sont intéressées au traitement de l'onychomycose due au genre *Fusarium*. Le traitement intermittent par itraconazole (400 mg/jour pendant 1 semaine avec 3 semaines d'arrêt, pendant 4 mois) ainsi que d'autres schémas de traitement par itraconazole ont montré des résultats variables voire minimes dans l'élimination de *Fusarium* au niveau des ongles de pied. Dans une étude japonaise, l'éfinaconazole en topique, l'itraconazole oral et le fosravuconazole par voie orale ont donné de bons résultats dans le traitement de l'onychomycose à *Fusarium*. Un patient atteint d'onychomycose à *Fusarium falciforme*, résistant à l'itraconazole et à la terbinafine a été traité avec succès par posaconazole (800 mg/jour pendant 1 semaine avec 3 semaines d'interruption du traitement, pendant 4 mois). Chez des patients présentant une onychomycose à *Fusarium* réfractaire, certains auteurs recommandent un traitement par amphotéricine B topique associé à l'avulsion de l'ongle infecté [155–158].

### 6.2.2. Kératites

Tout comme les onychomycoses, il n'existe pas de recommandations de traitement pour les kératites à *Fusarium*. Cette pathologie est difficile à traiter et son évolution varie selon le délai du diagnostic, la virulence des souches et leur sensibilité aux antifongiques. En plus d'une résistance fréquente des isolats, le traitement des kératites à *Fusarium* est freiné par la faible pénétration des antifongiques dans les tissus oculaires. Les quelques molécules efficaces sont coûteuses et souvent difficiles à obtenir dans les pays à faible revenu et à revenu intermédiaire, où la prévalence est la plus élevée. Selon les études, l'utilisation de la natamycine en topique à 5 % serait le traitement de première intention. En l'absence de natamycine, le choix est plus compliqué par manque de preuves d'efficacité. La thérapie de première ligne comprend l'amphotéricine B en topique à 0,15 % et le voriconazole en topique à 1 % entre autres [159,160].

La natamycine présente un large spectre antifongique, couvrant la majorité des espèces de *Fusarium*. Selon une méta-analyse, la natamycine serait très efficace dans le traitement de la kératite initiale à *Fusarium* comparée à d'autres antifongiques [161]. L'amphotéricine B montre des CMI similaires voire inférieures à celle de la natamycine dans les essais de sensibilité *in vitro* sur le genre *Fusarium*. De ce fait, l'amphotéricine B semble être l'antifongique de choix dans le traitement des kératites lorsque la natamycine n'est pas accessible en première intention [162,163].

Les données concernant le voriconazole sont variables en fonction de l'évaluation *in vitro* et *in vivo*. En effet, la natamycine est plus sensible *in vitro* que le voriconazole, particulièrement pour le complexe d'espèces *Fusarium solani*, connu pour son pronostic plus défavorable que les autres complexes [159,164]. A l'inverse, un modèle animal expérimental de kératite à *Fusarium solani* a montré que le voriconazole était plus efficace que la natamycine et l'amphotéricine B [165].

Des études se sont intéressées également aux potentiels effets synergiques de ces 3 molécules. Aucun effet n'a été mis en évidence pour la natamycine et l'amphotéricine B, ceci est probablement lié à leur mode d'action similaire. De manière intéressante, l'association en topique de natamycine et de voriconazole a montré une synergie entre 23 et 70 % dans l'inhibition des isolats de *Fusarium*. Cette combinaison pourrait être bénéfique dans le traitement des kératites dues à ce champignon [166–168]. Il est intéressant de noter une

association atypique d'amphotéricine B et de rifampicine. Cette dernière molécule ne présente aucun effet antifongique. Cependant, il a été montré pour le complexe d'espèces *Fusarium solani*, une synergie allant de 12 à 94 % pour différentes concentrations de rifampicine (entre 4 et 32 µg/mL). Des recherches supplémentaires permettraient de confirmer l'utilisation de cette combinaison en clinique [169].

### 6.2.3. Mycétomes

Les agents antifongiques décrits dans la littérature pour traiter les mycétomes à *Fusarium* sont l'amphotéricine B sous forme désoxycholate ou lipidique, les azolés (kétoconazole, itraconazole), la terbinafine et la flucytosine (5FC). Cependant il n'existe pas de recommandations dans le traitement antifongique du mycétome. Les données sur ce type d'infection et son traitement montrent que l'itraconazole est l'antifongique le plus fréquemment prescrit, puis le kétoconazole suivi par l'amphotéricine B [79].

Bien que présentant une activité modérée en fonction du complexe d'espèces de *Fusarium*, le voriconazole et le posaconazole présenteraient une efficacité dans le traitement du mycétome dû à ce type de champignon. Au vu de leur pénétration tissulaire et de leur biodisponibilité, ils pourraient réduire la nécessité d'interventions chirurgicales [79,170]. Gardant toujours une place importante dans le traitement des mycétomes fongiques, la chirurgie est évaluée après un traitement antifongique préalable de plusieurs mois. Elle est complexe car elle doit être la plus efficace en éliminant la totalité des grains mais également la moins mutilante possible. La présence de grains restants entraînerait une reprise du processus infectieux. Le risque à long terme en cas de récurrences répétées est l'amputation [76].

### 6.2.4. Infections cutanées

Tout comme les précédentes formes cliniques, il n'existe actuellement aucun traitement de référence pour le traitement des infections cutanées à *Fusarium*.

De manière générale, une intervention chirurgicale est nécessaire par débridement ou détersion afin de retirer les tissus lésés autant que possible. Un traitement en topique peut être administré par la suite. Les 2 molécules d'intérêt thérapeutique sont la ciclopiroxolamine [83] et l'amphotéricine B. Il est à noter que l'amphotéricine B se présente sous forme de suspension buvable et est utilisée dans le traitement des muqueuses. Il n'existe pas de forme galénique pour usage externe cutané [84]. De manière isolée, une étude a montré un effet bénéfique dans le traitement de la fusariose cutanée à *Fusarium solani* par l'application locale de chaleur [171]. Le traitement par voie systémique est possible avec l'amphotéricine B, le voriconazole ou le posaconazole [84].

### 6.2.5. Fusarioses invasives

Le traitement des fusarioses invasives affectant l'immunodéprimé est complexe. En effet, il n'existe pas dans la littérature d'études cliniques randomisées ayant comparé les différentes stratégies thérapeutiques possibles. La restauration de l'immunité est fortement recommandée dans la mesure du possible. Le traitement précoce d'une infection localisée est également un point important à prendre en compte afin de prévenir l'évolution vers une infection plus agressive voire disséminée. Selon la société européenne de microbiologie clinique et des maladies infectieuses, ESCMID (European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases) et la confédération européenne de mycologie médicale, ECMM (European Confederation of Medical Mycology), ces deux critères sont fortement recommandés dans la prise en charge des fusarioses invasives (respectivement grades AIII et AII) [102,172].

Chez les patients immunodéprimés, le voriconazole, l'amphotéricine B sous différentes formulations (désoxycholate ou forme lipidique), et diverses combinaisons ont été étudiées, rapportant des succès variables. L'utilisation du voriconazole en première ligne de traitement nécessite une surveillance thérapeutique. Le taux de réponse dépend du site d'infection et des conditions du patient [173,174]. Concernant l'amphotéricine B, les données littéraires sont diverses selon la formulation de la molécule. Il a été montré que les isolats pouvaient être résistants à la molécule. De plus, le traitement présente en lui-même une toxicité importante [101,175].

Quelques études se sont intéressées à la combinaison d'antifongiques dans le traitement des fusarioses invasives. Les résultats ne montrent pas de bénéfice significatif par rapport à un traitement par voriconazole seul [173,174,176–179]. Les recommandations de l'ESCMID et de l'ECMM portent sur l'utilisation privilégiée du voriconazole et de l'amphotéricine B sous forme lipidique, présentant moins d'effets secondaires que l'amphotéricine B désoxycholate [172]. Néanmoins, les données récentes publiées donnent le même niveau de recommandation à la monothérapie et à la combinaison thérapeutique. Une thérapie combinée est à envisager selon la gravité de la fusariose invasive, les concentrations sériques incertaines de voriconazole et les CMI élevées de l'isolat de *Fusarium* aux deux molécules d'intérêt [180].

D'autres molécules antifongiques, comme le posaconazole, l'isavuconazole et la terbinafine, en monothérapie ou en association, ont été évaluées dans le traitement primaire de la fusariose invasive. Cependant, au vu des données limitées, leur implication dans le traitement de cette pathologie reste à établir [37,181].

L'équipe de Varon a évalué l'intérêt d'une prophylaxie antifongique primaire par voriconazole et posaconazole dans une étude cas témoins chez des patients à risque. L'étude conclut à plusieurs recommandations soit un examen dermatologique approfondi des extrémités à l'admission, une culture de toute lésion cutanée ou unguéale suspecte, et enfin une prophylaxie primaire par azolé (voriconazole ou posaconazole) en cas de culture positive à *Fusarium* [86].

Il est reconnu que les patients avec antécédents d'infections fongiques invasives sont à risque de présenter une récurrence de l'infection fongique lors d'une nouvelle période d'immunodépression. Déjà bien établie pour l'aspergillose invasive [182], l'utilisation d'une prophylaxie secondaire dans le cas des fusarioses invasives a été évaluée dans une étude rétrospective multicentrique de 40 patients. Il s'agissait de patients exposés à des périodes ultérieures d'immunosuppression et ayant déjà été traités avec succès pour une fusariose invasive. L'équipe de Nucci a montré que 25 % des patients sans prophylaxie ont présenté une rechute, contre seulement 10 % des patients ayant reçu une prophylaxie secondaire par voriconazole. Ces données suggèrent fortement la mise en place de prophylaxie secondaire chez des patients ayant des antécédents de fusariose invasive [183]



**DEUXIEME PARTIE**

**EXPLORATION DES**

**MECANISMES DE RESISTANCE**

**AUX AZOLES**

**CHEZ LE COMPLEXE**

**D'ESPECES *FUSARIUM SOLANI***



# 1. CONTEXTE SCIENTIFIQUE

## 1.1. Résistance aux antifongiques azolés

L'arsenal thérapeutique est limité en antifongiques et comprend la flucytosine, les échinocandines, les polyènes, les allylamines et les azolés [184]. La flucytosine (5-fluorocytosine) inhibe le métabolisme de la pyrimidine et par conséquent la synthèse de l'ADN. Le mécanisme d'action des échinocandines (caspofungine, anidulafungine et micafungine) se fait par inhibition de la biosynthèse du bêta-1,3-D-glucane, un composant structural majeur de la paroi cellulaire. Les polyènes comme l'amphotéricine B se lient à l'ergostérol, composé essentiel de la membrane plasmique, et forment des pores perturbant le fonctionnement de la cellule fongique. Enfin, les allylamines (terbinafine) et les azolés (par exemple, le fluconazole, le voriconazole et le posaconazole) ont un impact sur la biosynthèse de l'ergostérol [185].

Il est reconnu que l'utilisation généralisée et importante d'agents antimicrobiens favorise l'apparition de la résistance à ces médicaments [186]. Cette résistance n'est pas sans conséquence sur la morbidité, la mortalité et les coûts des soins de santé dans les hôpitaux. Suite à des observations de l'EUCAST et du CLSI, il a été signalé l'apparition de résistance acquise aux antifongiques chez les principales espèces de *Candida*. Une étude de surveillance de la candidémie à *C. glabrata* basée sur la population a montré une augmentation d'isolats non sensibles aux échinocandines de 4,2 % à 7,8 % entre 2008 et 2014 aux Etats-Unis [187]. Par ailleurs, l'augmentation de la résistance aux échinocandines chez *C. glabrata* semble s'accompagner d'une résistance aux azolés. Une augmentation de la résistance au fluconazole, de 9 % à 14 %, au cours des périodes 1992-2001 et 2001-2007 a été signalée par le programme de surveillance antifongique ARTEMIS (Etats-Unis) [188,189]. Une méta-analyse sur 79 études conduites en Amérique, Asie, Europe et Afrique a montré que 11,6 % des cas de fongémies à *Candida parapsilosis* avant 2016 présentaient une résistance au fluconazole contre 36,7 % entre 2016 et 2022 [190].

Chez les filamenteux, le pourcentage de patients présentant une souche d'*Aspergillus fumigatus* résistant aux azolés est passé à 12 % entre 1998 et 2002 aux Pays-Bas [191]. Dans une étude située aux Pays-Bas, la résistance aux azolés a augmenté de 6 % par an entre 2000 et 2009. De manière générale, ce type de résistance est variable selon le pays en Europe [192]. L'émergence de résistance acquise aux médicaments parmi les agents pathogènes fongiques a limité dans

certains cas les options thérapeutiques. Il s'agit actuellement d'une préoccupation majeure des cliniciens en charge de patients à risque élevé de mycoses invasives.

La résistance à un antifongique peut être de deux types, naturelle ou acquise. La résistance naturelle concerne certaines espèces fongiques présentant une résistance intrinsèque à certains médicaments voire à tous les antifongiques disponibles. De nombreuses études épidémiologiques signalent les espèces de *Scedosporium* et *Lomentospora* (anciennement *Scedosporium*) *prolificans* comme étant à l'origine d'infections fongiques invasives chez les patients immunodéprimés. Bien que l'activité antifongique soit variable vis-à-vis de ces espèces pour différents antifongiques, *L. prolificans*, quant à lui, est présenté comme résistant à toutes les thérapeutiques disponibles en clinique [193–195].

A l'inverse, la résistance à un antifongique ou à une classe thérapeutique, peut se développer et être acquise après exposition à ces médicaments. Comme énoncé précédemment, il est apparu une résistance acquise accrue aux azolés chez différents champignons au cours des dernières décennies. Chez *Aspergillus fumigatus*, le phénomène de résistance aux azolés est largement répandu et a été signalé pratiquement dans le monde entier. La résistance a pu se développer selon deux schémas. L'exposition de souches de l'environnement d'*A. fumigatus* à des composés azolés utilisés comme fongicides et chimiquement similaires aux médicaments utilisés en clinique est responsable du développement de la résistance aux azolés. De plus, l'utilisation en clinique d'azolés au long cours chez les patients peut entraîner l'apparition de résistances et favoriser la survie du champignon. Il est à noter que, selon les données de la littérature, environ 70 % des patients atteints d'aspergillose résistante aux azolés n'avaient reçu aucun traitement azolé au préalable [196,197]. Les deux principaux mécanismes de la résistance chez *A. fumigatus* sont les mutations de la cible, la 14 $\alpha$ -stérol déméthylase, et la présence de zones répétées en tandem au niveau du promoteur du gène codant l'enzyme cible [198].

Chez les champignons, la résistance aux azolés implique de multiples mécanismes. Il peut s'agir de (i) modifications qualitatives ou quantitatives de la cible, de (ii) phénomènes de régulation du transport de la molécule à travers la membrane (efflux et imperméabilité) ou de (iii) modifications cellulaires permettant aux champignons une meilleure tolérance de l'antifongique (diminution de la toxicité, résistance au stress induit par la molécule) (Figure 21) [184,185,193]. Il a été montré que l'exposition d'un champignon à un antifongique induit un stress au niveau des cellules fongiques. Ces dernières développent alors des mécanismes d'adaptation immédiate (maintien de l'intégrité cellulaire, mécanismes d'efflux) ou sur le long

terme (instabilité génomique et diversité génétique), favorisant l'apparition de mutants résistants [199].

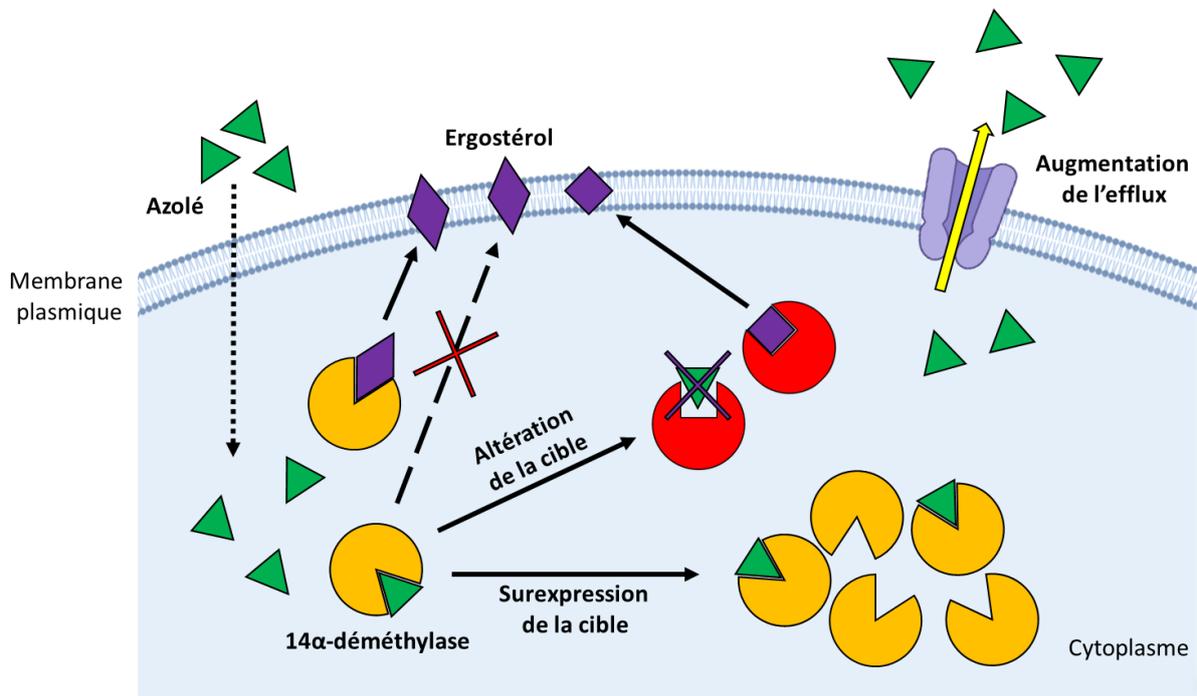


Figure 21 : Mécanismes de résistance aux azolés chez les champignons

La synthèse de l'ergostérol est assurée par une enzyme, la 14 $\alpha$ -déméthylase. L'antifongique de la classe des azolés diminue la synthèse de ce composé en inhibant l'enzyme. La résistance aux azolés implique de multiples mécanismes : (i) modifications qualitatives ou altération de la cible, (ii) modifications quantitatives ou surexpression de la cible, et (iii) phénomènes de régulation du transport de la molécule à travers la membrane (efflux)

## 1.2. Mutation de CYP51, cible des azolés

Le mécanisme d'action des antifongiques azolés réside dans l'inhibition de la synthèse de l'ergostérol, constituant majeur de la membrane, l'enzyme cible de ces molécules étant la 14 $\alpha$ -stérol déméthylase [200,201]. La déplétion en ergostérol et l'accumulation de métabolites toxiques entraînent la mort cellulaire (Figure 22). Des mécanismes de résistance ont été décrits pour les genres *Candida* ou *Aspergillus*.

Chez *Aspergillus fumigatus*, le principal mécanisme de résistance aux azolés est la mutation du gène *CYP51* codant pour l'enzyme cible de cette classe d'antifongiques, la 14 $\alpha$ -stérol déméthylase. Il existe deux gènes différents, *CYP51A* et *CYP51B*, chacun codant des protéines distinctes. Les principales mutations induisant une résistance aux azolés ont été décrites pour

*CYP51A*, au niveau des codons 54, 220 et 98 [202]. Par ailleurs, il a également été décrit des souches résistantes aux azolés par la présence de zones répétées en tandem de 34, 46 ou 53 paires de bases. Ces zones se situent au niveau de la région promotrice du gène *CYP51A*. Leur présence induit une surexpression du gène à l'origine de la résistance. Il est très souvent observé l'association de ces différents mécanismes de résistance entre eux, altération et surexpression de la cible [203,204].

La multirésistance du complexe d'espèces *Fusarium solani* est connue, cependant, il n'existe actuellement pas de données expliquant la faible sensibilité au voriconazole. Chez le complexe d'espèces *Fusarium solani*, la 14 $\alpha$ -stérol déméthylase est codée par le gène *CYP51* et est présente sous trois isoformes A, B et C [205].

Peu d'études se sont concentrées sur les complexes d'espèces de *Fusarium*, et leur résistance aux azolés utilisés en clinique. Le genre *Fusarium* étant un phytopathogène, des études en biologie végétale sur *Fusarium graminearum*, un membre du complexe d'espèces *Fusarium sambucinum* (FSAMSC), et le complexe FOOSC ont montré que le gène *CYP51A* code une 14-déméthylase inductible, déterminant la sensibilité aux azolés. Au contraire, *CYP51B* est une 14-déméthylase impliquée dans la formation des ascospores, mais peu impactée par les antifongiques. La protéine *CYP51C* est retrouvée chez *Fusarium*. Cependant, son rôle n'est pas clairement établi. Des études montrent que *CYP51C* n'est pas impliquée dans la 14-déméthylation du stérol, cependant la délétion du gène augmente la sensibilité à certains inhibiteurs de la déméthylase [206,207].

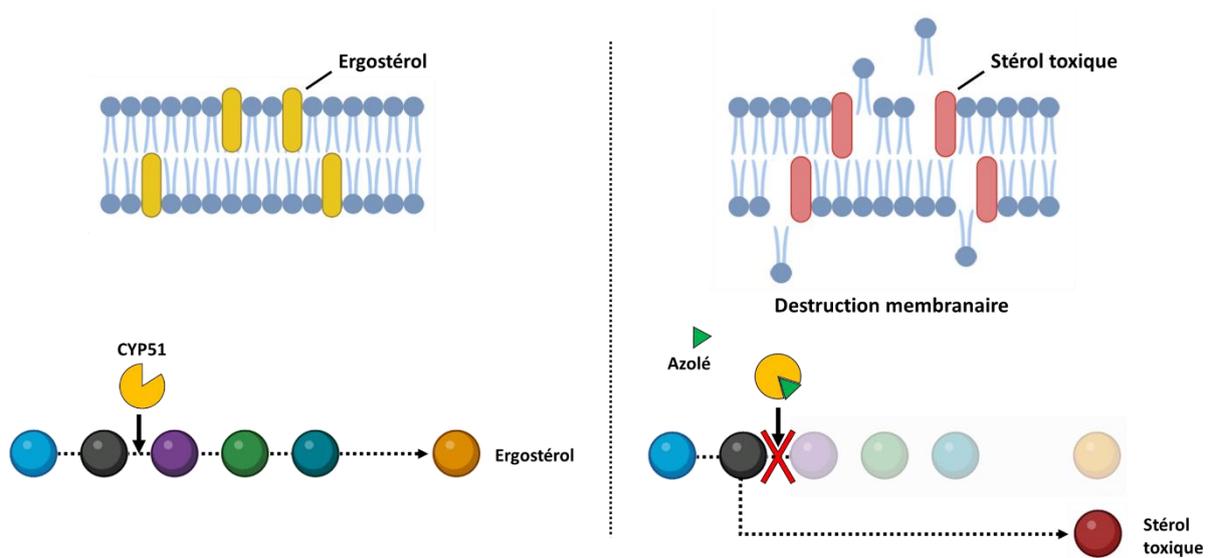


Figure 22 : Mécanisme d'action des azolés

Les azolés ciblent l'enzyme de biosynthèse de l'ergostérol, la 14 $\alpha$ -déméthylase, codée par les gènes CYP51A, B et C chez *Fusarium solani*. L'inhibition de l'enzyme entraîne un arrêt de la production d'ergostérol et l'accumulation de stérols intermédiaires toxiques produits par voie dérivée. Ce stérol déstabilise la membrane plasmique, inhibant la croissance des champignons (adapté d'après Revie *et al.*, 2018 [208])

### 1.3. Efflux et transporteurs

Les champignons sont constamment en contact avec des composés toxiques. Il peut s'agir de molécules synthétisées par d'autres micro-organismes pour limiter la croissance du champignon sur des ressources partagées et peu abondantes. Ces molécules peuvent également être produites comme mécanisme de défense par les hôtes, ou il s'agit de substances utilisées en thérapeutique comme les antifongiques.

Afin de survivre, le champignon développe des mécanismes comme l'efflux actif. Celui-ci empêche l'accumulation intracellulaire du composé et, par conséquent, induit une tolérance voire une résistance du champignon à la molécule. La littérature décrit plusieurs transporteurs impliqués dans la pathogénicité des champignons et la résistance aux antifongiques. Les deux catégories principalement responsables de ces mécanismes sont les transporteurs de la famille ABC (ATP-Binding Cassette) et MFS (Major Facilitator Superfamily) [209]. Ensemble, ils représentent environ la moitié des gènes présents codant des transporteurs au niveau des génomes fongiques.

Selon la littérature, il existe 9 superfamilles de protéines ABC, ABCA à ABCI [210]. Les protéines appartenant aux catégories ABCE, ABCF et "ABCG other" sont solubles, tandis que les autres familles ABCA, ABCB, ABCC, ABCD, ABCH et ABCI sont des transporteurs transmembranaires. La quantité de transporteurs ABC chez les champignons filamenteux est généralement deux à trois fois plus importante que chez les levures [211–213]. Cependant, pour la plupart d'entre eux, la fonction biologique des transporteurs ABC reste inconnue. De plus, aucune corrélation entre la quantité de ces transporteurs dans les génomes fongiques et la pathogénicité du champignon n'a été mise en évidence [209].

Un grand nombre d'études se sont intéressées à la résistance aux azolés chez le genre *Candida* [214–216]. L'utilisation d'inhibiteurs de pompes d'efflux entraînerait une diminution de la valeur des CMI à l'antifongique pris en charge par ce mécanisme de transport. La délétion du gène codant la protéine d'efflux a permis également de restaurer un profil de sensibilité de type sauvage vis-à-vis de la molécule antifongique. Des transporteurs et d'autres protéines d'efflux pourraient jouer un rôle dans la résistance aux antifongiques chez le genre *Fusarium* [217–220].

## 1.4. Coût d'adaptation ou « Fitness cost »

Pendant longtemps, il était admis que la résistance aux antimicrobiens entraînait un coût d'adaptation pour le germe au moment de l'apparition de la résistance. Le maintien de la résistance en l'absence d'antimicrobien était également dépendant de ce coût. La résistance implique généralement ce qui est appelé un « fitness cost », l'acquisition d'une résistance se faisant au dépend du développement du microorganisme ou de sa virulence. Il a été montré que l'altération d'une cible antibactérienne chez *Escherichia coli* pouvait avoir un effet négatif sur sa fonction primaire.

Bien que les connaissances sur les coûts d'adaptation de la résistance aux antifongiques soient encore incomplètes, l'évolution permettrait de compenser certains coûts d'adaptation par des mutations ultérieures. Certaines résistances apporteraient un avantage en terme d'adaptation pour le champignon [221–223]. Le maintien de la résistance chez les champignons peut s'expliquer par la diploïdie de certaines espèces. En effet, le coût de l'adaptation par mutation sur un chromosome réduisant la sensibilité à un antifongique peut être diminué par la

conservation du gène non muté sur l'autre chromosome, maintenant la fonction originale du gène [224].

Plusieurs études sur les levures du genre *Candida* ont fait état d'une augmentation et d'une diminution de la capacité d'adaptation, mais également de disparités entre les modèles *in vitro* et *in vivo* [225–228].

Chez certains filamenteux, le « fitness cost » a été décrit comme minime voire totalement absent. En effet, chez *Aspergillus fumigatus* porteur de la mutation G54W ou M220K dans *CYP51A*, les capacités de croissance et de conidiogénèse étaient similaires à celles des souches non mutées. Les mêmes constatations ont été faites sur les études de compétition en l'absence d'azolés, il n'y avait aucun coût d'adaptation *in vitro* ou *in vivo* par rapport à la souche parentale [229].

Les modèles murins sont souvent utilisés dans la recherche sur l'aspergillose invasive. Cependant, devant l'impact bioéthique de l'expérimentation animale classique, de nouveaux modèles d'hôtes invertébrés ont vu le jour, comme *Galleria mellonella*, communément appelé la fausse teigne de la cire ou teigne de ruches. De plus, les données de la littérature suggèrent que les réponses immunitaires sont communes et anciennes phylogénétiquement parlant et donc présentes dans l'ensemble du règne animal, vertébrés et invertébrés [230]. La forme larvaire de *G. mellonella* présente de nombreux avantages dans l'étude de la virulence fongique (facilité de manipulation, coût faible, entretien simple) et elle a déjà été utilisée pour étudier la virulence du genre *Aspergillus* et *Fusarium* [48,231–233].

## 2. PROBLEMATIQUE

Agent étiologique de mycoses invasives, le complexe d'espèces *Fusarium solani* est redouté en pathologie humaine de par son mauvais pronostic. L'arsenal thérapeutique pour le traitement des fusarioses est très limité, ces champignons étant de sensibilité diminuée à la plupart des antifongiques. À ce jour, le traitement de référence des fusarioses est le voriconazole, plus ou moins associé à l'amphotéricine B [234,235]. Malgré ces recommandations, de nombreuses études ont montré une grande variabilité de sensibilité au voriconazole [142,236,237]. La prise en charge thérapeutique est complexe du fait de la variabilité des CMI au voriconazole au sein du complexe mais également de l'absence de corrélation entre les effets observés *in vitro* et ceux *in vivo*.

La caractérisation des mécanismes de résistance impliqués dans la diminution de sensibilité du complexe d'espèces *F. solani* aux azolés est essentielle pour la prise en charge de la fusariose. Leur compréhension permettrait d'adapter le traitement de ce pathogène multi-résistant, voire de proposer de nouvelles alternatives thérapeutiques.

Le projet RAFU (Résistance aux Azolés chez *Fusarium*) s'est articulé autour de différentes approches. Il conviendra tout d'abord de caractériser les souches de *F. solani* utilisées pour cette étude, en évaluant la concentration minimale inhibitrice (CMI) aux différents antifongiques azolés. Une étude de potentiels coûts d'adaptation a été ensuite réalisée avec une approche *in vitro* par l'étude de courbes de croissance et une approche *in vivo* en utilisant le modèle invertébré *Galleria mellonella*. L'impact d'un traitement par voriconazole sur la survie des larves a également été évalué sur différentes souches de CMI variables. Suite à ces premières étapes, l'étude des mécanismes de diminution de sensibilité a été organisée autour de trois axes : (i) modification qualitative par mutation de *CYP51*, (ii) modification quantitative par variation d'expression de *CYP51*, et (iii) phénomènes d'efflux.

### 3. DETERMINATION DES CMI

#### 3.1. Matériels et méthodes

##### 3.1.1. Souches étudiées

Dix-sept souches du complexe d'espèces *Fusarium solani* ont été étudiées. Le Tableau 4 récapitule les différentes informations de ces souches (numéros de référencement, origines et génotypes).

Tableau 4 : Souches utilisées pour le projet RAFU (caractéristiques et génotypes)

Identification laboratoire	Numéro de référencement	Génotype <sup>1</sup>	Origine	
			Localisation	Géographie
FSSC20	CBS 124901	2-w	Peau	France
FSSC21	CBS 124631	1-b	Ongle	France
FSSC25	CBS 124895	5-o	Peau	France
FSSC29	CBS 124889	2-d	Ongle	France
FSSC36	CBS 124890	5-v	Ongle	France
FSSC45	CBS 124898	2-d	Peau	Gabon
FSSC47	CBS 124892	20-f	Ongle	Gabon
FSSC86	CBS 102824	25-d	Fragment de plaque	Colombie
FSSC90	CBS 208,29	25-d	Plante (jacinthe)	Allemagne
FSSC98	CBS 119996	5-kk	Plante (carotte)	Hollande
FSSC99	CBS 119223	21-f	Plante (carotte)	Espagne
FSSC102	CBS 115659	21-c	Plante (pomme de terre)	Allemagne
FSSC111	CBS 115660	21-d	Plante (pomme de terre)	Egypte
FSSC112	CBS 115658	21-e	Plante (pomme de terre)	Israël
FSSC115	CBS 109028	28-c	Nodule sous cutané	Suisse
FSSC118	CBS 224,34	1-b	Ongle	Cuba
FSSC121	CBS 117608	6-f	Peau	Turquie

<sup>1</sup> Génotypes selon la classification de O'Donnell *et al.* [138]

Les souches ont été cultivées sur milieu de Sabouraud gélosé (Sigma Aldrich) à 30°C. Elles ont été stockées et conservées dans un mélange contenant 1 mL de glycérol et 1 mL d'eau physiologique à -20°C.

### 3.1.2. Préparation des solutions antifongiques

Les antifongiques étudiés sont le voriconazole (VRZ), l'itraconazole (ITZ), le posaconazole (PSZ) et l'isavuconazole (IVZ), solubilisés dans du diméthylsulfoxyde et conservés à - 20°C, selon le protocole CLSI M38-A2 [238].

La gamme de concentrations s'étend de 0,03 à 16 µg/mL. Une seconde gamme de concentrations pour IVZ allant de 2 à 128 µg/mL a également été réalisée afin de mesurer plus précisément les CMI précédemment trouvées supérieures à 16 µg/mL pour certaines souches. Il n'a pas pu être réalisé de gammes de concentrations supérieures à 16 µg/mL pour PSZ et ITZ du fait de leur faible solubilité en solution aqueuse.

### 3.1.3. Préparation de l'inoculum

Les souches fongiques ont été mises en culture sur milieu de Sabouraud dextrose bouillon (SBD) gélosé, afin de favoriser la conidiogénèse. Les cultures ont été incubées à 30°C pendant 48 à 72 h. Une suspension de la souche a été préparée dans une solution NaCl 0,9 % par grattage de la culture. Après filtration sur papier Miracloth pour éliminer les filaments et autres grosses particules, la suspension de conidies a été transférée dans un tube stérile, et homogénéisée par agitation au vortex. La concentration de l'inoculum a été ajustée afin d'obtenir une densité optique (DO) ( $\lambda = 530 \text{ nm}$ ) entre 0,15 et 0,17.

Une dilution au 1:50ème de cette suspension a été réalisée afin d'obtenir la solution de travail, avec un inoculum compris entre 0,4 et  $5 \cdot 10^4$  unités formant-colonie par millilitre (UFC/mL). L'inoculation de la plaque se fait par ajout de 100 µL de cette suspension diluée dans chaque puits, excepté le puits contrôle négatif (remplacé par 100 µL d'eau stérile). La plaque est incubée à 35°C pendant 48 h. Selon les recommandations du CLSI M38-A2, pour chaque plaque 96 puits, une souche contrôle (*Fusarium falciforme* ATCC MYA3636) est testée en parallèle de celles étudiées.

La densité de l'inoculum est vérifiée par ensemencement au râteau de 10  $\mu$ L d'une dilution au 1:10ème de la solution de travail sur un milieu gélosé SBD. Les colonies sont dénombrées à 24 h et 48 h d'incubation à 30°C. L'inoculum est considéré comme conforme pour une valeur comprise entre 4 et 50 UFC/mL.

### 3.1.4. Détermination des concentrations minimales inhibitrices et effectrices en microdilution

La détermination de la CMI, effectuée selon la méthode de référence CLSI M38-A2 [238], se fait par lecture du fond de la plaque grâce à un miroir et correspond à la concentration pour laquelle il est observé 100 % d'inhibition de croissance fongique.

Chaque souche a été testée en triplicat (réplicat biologique) et pour chaque détermination de CMI, les souches ont été testées en duplicat (réplicat technique).

La concentration minimale effectrice (CME) est la plus faible concentration d'antifongique qui entraîne des changements macroscopiques au niveau de la croissance filamenteuse par rapport à la croissance dans le puits contrôle. Les CME pour chaque souche ont été évaluées en même temps que les CMI, par observation microscopique des puits de la microplaque au microscope inversé.

Les représentations graphiques de ces données ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

## 3.2. Résultats

Le voriconazole est l'antifongique avec des variabilités de CMI les plus importantes entre les souches allant de 2 et 16  $\mu$ g/mL et présentant une médiane de 8  $\mu$ g/mL (Figure 23). Huit souches parmi 17 (47 %) ont une valeur de CMI au VRZ à 8  $\mu$ g/mL.

Toutes les souches présentent des CMI élevées pour l'itraconazole et le posaconazole avec des valeurs supérieures à 16 µg/mL, sauf FSSC20, avec une CMI au PSZ de 8 µg/mL. La détermination de la valeur exacte des CMI supérieures à 16 µg/mL pour ITZ et PSZ n'a pas pu être réalisée en raison du manque de solubilité des agents azolés.

Comme le voriconazole, l'isavuconazole présente une variabilité de sensibilité au sein des différentes souches. Sa médiane de CMI est de 16 µg/mL (intervalle de valeur de 4 à 64 µg/mL) (Tableau 5). Les CMI pour la souche de contrôle de qualité sont dans la plage attendue pour chaque expérience.

L'observation au microscope inversé des puits de la plaque montre que les CME des 17 souches correspondent aux valeurs de CMI retrouvées précédemment.

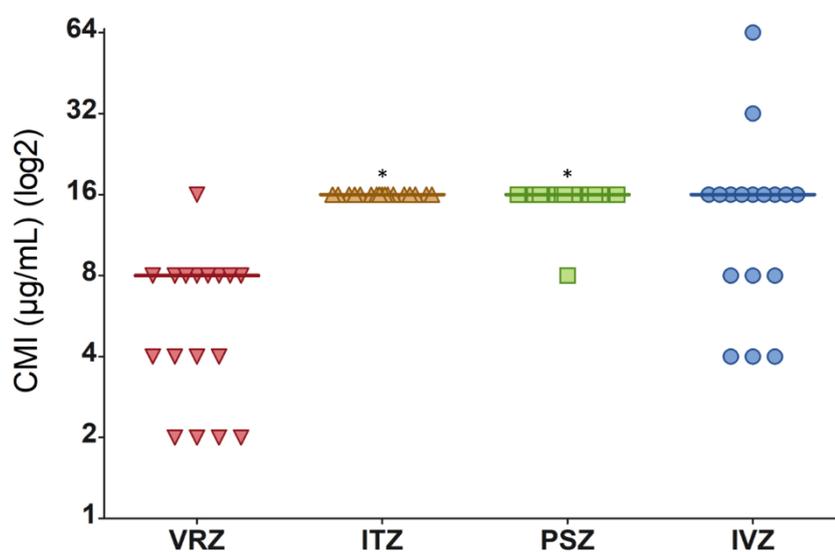


Figure 23 : Distribution des Concentrations Minimales Inhibitrices (CMI) (µg/mL) aux différents antifongiques pour les 17 souches de FSSC (VRZ : voriconazole, ITS : itraconazole, PSZ : posaconazole, IVZ : isavuconazole, \* : valeurs de CMI supérieures à 16 µg/mL, axe des ordonnés en échelle logarithmique de 2 (log2))

Tableau 5 : Médiane et intervalles des CMI aux antifongiques

Antifongiques	CMI (µg/mL)	
	Médiane	Intervalle
Voriconazole	8	2-16
Itraconazole	>16	/
Posaconazole	>16	/
Isavuconazole	16	4-64

### 3.3. Discussion

La détermination des CMI dans notre panel de souches FSSC a montré une faible sensibilité aux azolés utilisés en pratique clinique et une grande variabilité de sensibilité au voriconazole et à l'isavuconazole (les valeurs de CMI variant respectivement de 2 à 16 et de 4 à 64 µg/mL). Les valeurs de CMI retrouvées étaient proches de celles décrites dans la littérature avec un intervalle allant de 1 à 16 µg/mL pour les espèces du complexe *Fusarium solani* [36,133,239].

Ces résultats ont également révélé que toutes les souches FSSC présentaient des CMI à l'itraconazole et au posaconazole supérieures à 16 µg/mL, à l'exception de la souche FSSC20 qui avait une CMI<sub>PSZ</sub> de 8 µg/mL. Cette observation a également été rapportée dans d'autres études [133,234]. Tortorano *et al.* ont montré des résultats comparables pour le posaconazole puisque la majorité de leurs souches FSSC présentaient des CMI de 16 µg/mL, à l'exception d'une souche pour laquelle la CMI était de 1 µg/mL [235].

Concernant l'isavuconazole, les résultats ont montré un intervalle de valeurs de CMI plus large, de 4 à 64 µg/mL. La plupart des essais évaluant l'activité antifongique de l'isavuconazole vis-à-vis de *Fusarium* spp. ont montré des valeurs de CMI souvent supérieures à 16 voire à 32 µg/mL [145,181,234,240]. Les résultats de notre étude confirment les valeurs de CMI élevées précédemment rapportées et ont révélé que 64 % des souches FSSC présentaient des CMI supérieures ou égales à 16 µg/mL.

## 4. ANALYSE DU FITNESS COST

### 4.1. Matériels et méthodes

#### 4.1.1. Courbe de croissance

Sept souches de FSSC ont été étudiées (Tableau 6, souches soulignées). Pour chaque souche, une suspension à  $10^6$  conidies/mL a été préparée dans une solution de RPMI (Sigma-Aldrich®, Merck, Allemagne). Sur une plaque de 96 puits, un inoculum de 200  $\mu$ L a été déposé par puits. Pour une souche, 8 puits sont inoculés. Le témoin négatif correspond à 8 puits témoin contenant uniquement du milieu de culture RPMI.

La plaque a été ensuite incubée dans un lecteur d'absorbance thermostaté à 30°C. Une lecture de l'absorbance à 530 nm a été réalisée automatiquement toutes les heures pendant 72 heures. La valeur retranscrite pour les résultats correspond à la moyenne des 8 puits par lecture soustrait de la moyenne de l'absorbance des 8 puits témoin avec du RPMI seul.

Pour chaque souche, l'étude a été faite sur 2 réplicats biologiques dont 8 réplicats techniques à chaque expérience.

#### 4.1.2. Etude de la virulence des souches FSSC par le modèle

##### *Galleria mellonella*

Afin d'évaluer la virulence des différentes souches, une détermination de la survie de l'hôte après infection a été effectuée à l'aide du modèle invertébré *Galleria mellonella* (Figure 24A). Les larves de *G. mellonella* (Kreca Ento-Feed BV, Pays-Bas) ont été conservées à l'obscurité à température ambiante dans des boîtes adaptées contenant de la nourriture avant d'être utilisées.

La sélection des larves s'est faite sur la base (i) d'une mobilité normale avec la capacité de se retourner sur la face ventrale, (ii) d'une couleur uniforme et (iii) d'un poids compris entre 200 et 400 mg. Les larves ont été réparties au hasard par groupe de 8 ou 10, pour chaque série d'expériences.

Concernant les souches de FSSC, une suspension de  $10^7$  conidies par mL a été préparée dans du PBS (Sigma-Aldrich®, Merck, Allemagne). L'infection a été reproduite par l'injection de 10  $\mu$ L de la suspension précédemment préparée, à l'aide d'une aiguille, au niveau d'une ventouse ou « proleg » du dernier métamère (Figure 24B). Le champignon, se retrouvant alors dans l'hémolymphe de la larve, qui constitue un environnement stérile, va provoquer une infection fongique invasive. Après inoculation, les larves ont été incubées dans l'obscurité à 37°C.

La mortalité a été évaluée quotidiennement pendant quatre jours avec comme critères d'observation l'absence de capacité de retournement associé ou non à une mélanisation (Figure 24C). Pour chaque expérience, deux groupes de contrôle ont été réalisés : un groupe ne recevant aucune injection et un autre groupe subissant une injection contenant seulement le milieu de la suspension fongique (PBS).

Les expériences ont été réalisées sur 13 souches différentes et les résultats ont été regroupés pour l'analyse statistique par valeurs de CMI (CMI basses de VRZ à 2-4  $\mu$ g/mL et CMI hautes de VRZ à 8-16  $\mu$ g/mL) et par origine de la souche (clinique *versus* environnement) (Tableau 6). Chaque souche a été évaluée 2 fois sur un groupe de 8 ou 10 larves. Une analyse de Kaplan-Meier a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California USA) avec calcul du log-rank (risque alpha 0,05).

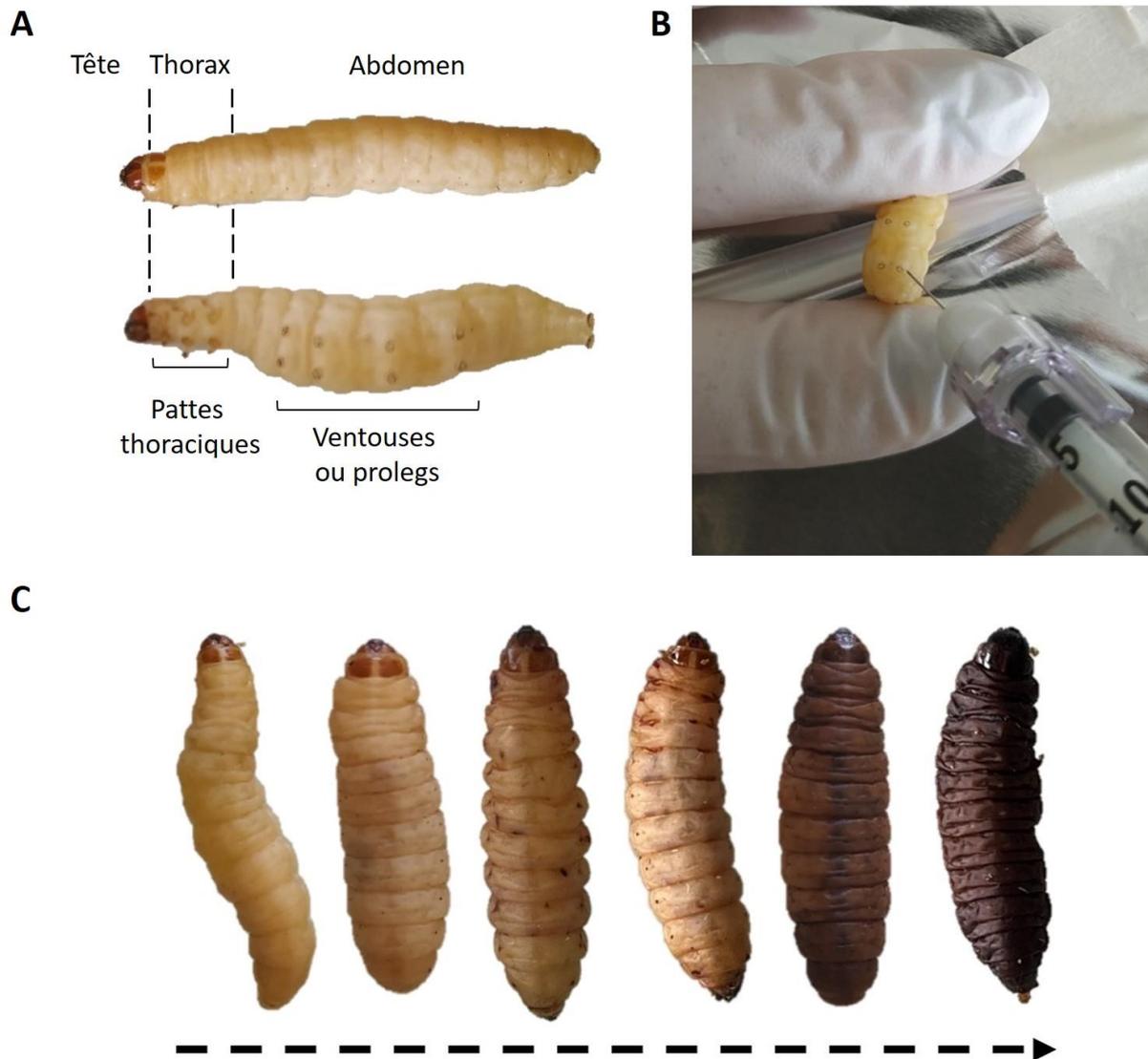


Figure 24 : Modèle invertébré *in vivo* : *Galleria mellonella*

**A.** Photographie d'une larve de *Galleria mellonella*, face dorsale et face ventrale. **B.** Injection d'un inoculum à une larve : l'aiguille est insérée à l'intérieur d'une ventouse ou « proleg ». **C.** Photos de différents stades de mélanisation d'une larve (diminution de viabilité de la larve de gauche à droite).

Tableau 6 : Souches utilisées pour l'étude de survie *in vivo* (13 souches) et pour l'étude de croissance (7 souches soulignées) (références et CMI au voriconazole (CMI<sub>VRZ</sub>), bleu : groupe CMI 2-4 µg/mL, orange : groupe CMI 8-16 µg/mL)

Identification laboratoire	Numéro de référencement	CMI <sub>VRZ</sub> (µg/mL)	Origine
FSSC20	CBS 124901	2	Clinique
FSSC102	CBS 115659	2	Environnement
<u>FSSC111</u>	CBS 115660	2	Environnement
<u>FSSC26</u>	CBS 124896	4	Clinique
FSSC45	CBS 124898	4	Clinique
FSSC98	CBS 119996	4	Environnement
<u>FSSC21</u>	CBS 124631	8	Clinique
<u>FSCC25</u>	CBS 124895	8	Clinique
<u>FSSC29</u>	CBS 124889	8	Clinique
FSSC86	CBS 102824	8	Environnement
<u>FSSC118</u>	CBS 224,34	8	Clinique
<u>FSSC121</u>	CBS 117608	8	Clinique
FSSC47	CBS 124892	16	Clinique

#### 4.1.3. Examen anatomopathologique d'une larve de *Galleria mellonella* infectée par FSSC

Des larves de *G. mellonella* ont été infectées par inoculation d'une suspension de 10<sup>6</sup> conidies/mL de la souche FSSC86. Les larves ont été euthanasiées et conservées dans du formol, après 24 heures d'incubation à 37°C à l'obscurité.

Une coupe sagittale suivie de colorations de Gomori-Gorcott (GG) et d'Hémalun-Eosine-Safran (HES) ont été réalisées par le laboratoire d'anatomopathologie afin de procéder à un examen microscopique.

#### 4.1.4. Etude de la sensibilité des souches FSSC aux antifongiques *in vivo* dans le modèle *Galleria mellonella*

Différentes doses de solutions commerciales de voriconazole VFEND® (8, 16, 32 et 64 µg) ont été utilisées pour déterminer la dose efficace d'antifongiques à utiliser. Les solutions mères d'antifongique aux différentes concentrations ont été préparées dans du NaCl 0,9 %. Un volume

de 10 µL de solution antifongique a été injecté deux heures après l'infection par la souche FSSC au niveau du « proleg » opposé à celui utilisé pour l'injection de l'inoculum. La dose la plus efficace, présentant une meilleure survie associée à une absence de toxicité, a été retenue pour les étapes suivantes de l'étude.

L'activité antifongique *in vivo* a été déterminée sur les souches FSSC20, FSSC29, FSSC47, FSSC86, FSSC98, FSSC102, FSSC118, FSSC121. Une première étape consistait à inoculer 10 µL d'une suspension de  $10^7$  conidies/mL de la souche d'intérêt chez les larves de *G. mellonella* (groupes de 8 à 10 individus). La solution antifongique à la dose efficace précédemment déterminée était ensuite injectée 2 heures après l'infection.

Le contrôle de la survie a été effectué quotidiennement pendant quatre jours. L'analyse des résultats a été réalisée sur 2 groupes (avec et sans voriconazole). Pour chaque expérience, deux groupes de contrôle ont été réalisés : un groupe recevant une injection du milieu de suspension (PBS) et un autre groupe avec injection d'antifongique à la dose optimale. Chaque souche de FSSC a été évaluée deux fois (réplicat biologique) sur des groupes d'individus constitués de 8 à 10 larves chacun. Une analyse de Kaplan-Meier a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California USA) avec calcul du log-rank (risque alpha 0,05).

## 4.2. Résultats

### 4.2.1. Courbe de croissance

Chaque souche montre une courbe de croissance qui lui est spécifique. En effet, la souche FSSC26 montre un début de croissance tardif, après 36 heures de culture, alors que la souche FSSC121 commence à croître en tout début de culture (Figure 25).

Il n'a pas été observé de différences entre les courbes de croissance réalisées avec les souches d'un même groupe de CMI au voriconazole, soit 2-4 µg/mL et 8-16 µg/mL. De manière générale, une croissance débutant entre 8 et 12 heures de culture a été observée, puis une phase régulière de croissance pour finir par un plateau autour de 60 heures de culture (Figure 26).

Les souches présentant une faible CMI au voriconazole ne semblent pas se développer plus rapidement que celles à forte CMI, dans des conditions *in vitro*.

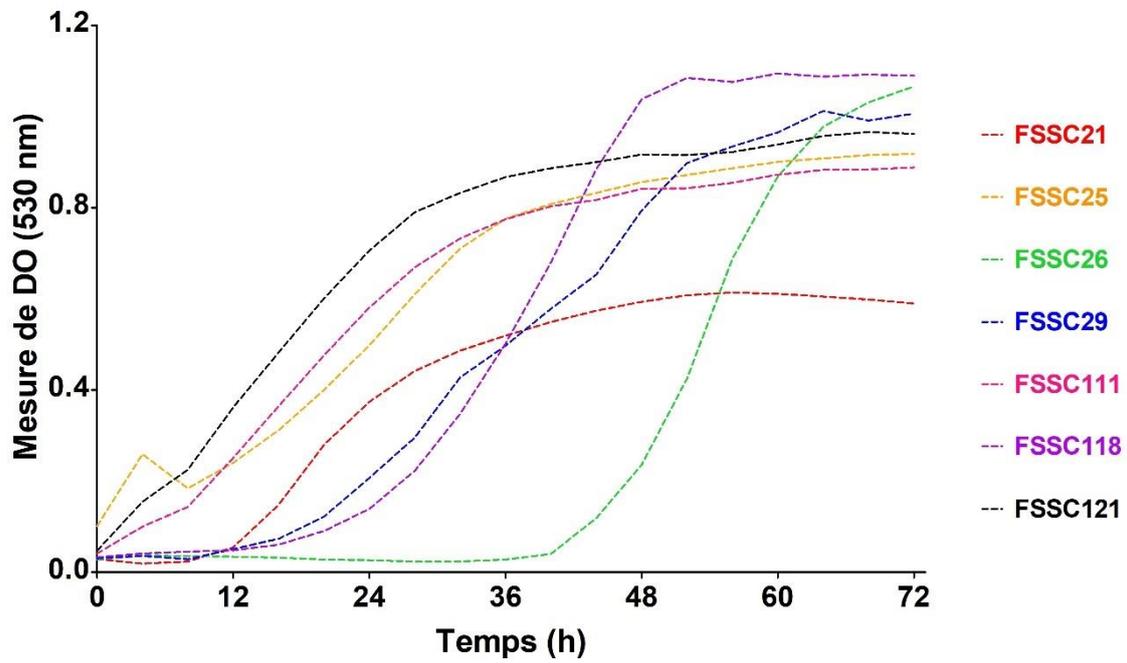


Figure 25 : Courbes de croissance des différentes souches FSSC

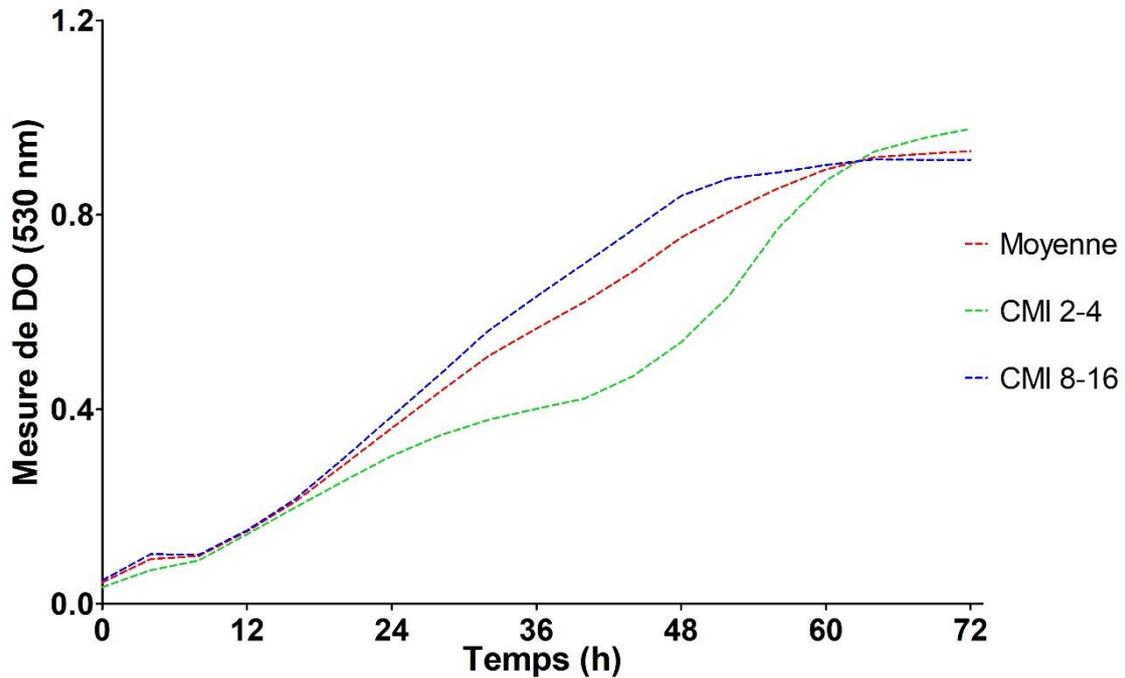


Figure 26 : Courbes de croissance des souches FSSC évaluées (moyenne : courbe rouge) ou réparties selon leur concentration minimale inhibitrice au voriconazole (2-4 µg/mL : courbe verte et 8-16 µg/mL : courbe bleue)

#### 4.2.2. Etude de la virulence des souches FSSC par le modèle

##### *Galleria mellonella*

Après inoculation d'une suspension de  $10^7$  conidies/mL pour chacune des 13 souches de *Fusarium solani*, la mortalité des larves de *G. mellonella* a été évaluée quotidiennement pendant 4 jours.

Dans le groupe de larves n'ayant subi aucune injection (contrôle) et celui des larves inoculées avec du PBS, la mortalité était quasi nulle (taux de mortalité de 0 % et 2 % respectivement pour le groupe contrôle et le groupe PBS).

Le taux de mortalité à 1 jour était de 68 % pour le groupe de larves infectées avec des souches du groupe CMI 2-4 µg/mL, et de 51 % pour le groupe CMI 8-16 µg/mL. Au 4<sup>ème</sup> jour, le taux de mortalité était égal à 95 % pour les deux groupes. Les souches de *Fusarium solani* résistantes au voriconazole (CMI 8-16 µg/mL) semblent présenter une virulence plus faible à celles présentant une CMI plus faible au voriconazole (Figure 27). Ces résultats suggèrent une

tendance au « fitness cost » entre virulence et résistance aux antifongiques pour les souches du complexe d'espèces *Fusarium solani*.

La virulence des souches FSSC a également été évaluée selon l'origine des souches. Ainsi, le groupe des larves infectées par des souches cliniques, toute valeur de CMI confondu, présente un taux de mortalité au 2<sup>ème</sup> jour de 82 %, contre 65 % pour celui correspondant aux souches environnementales. La virulence des souches cliniques est significativement plus importante que celle des souches environnementales, selon le test Log-rank ( $p=0.003$ ) (Figure 28).

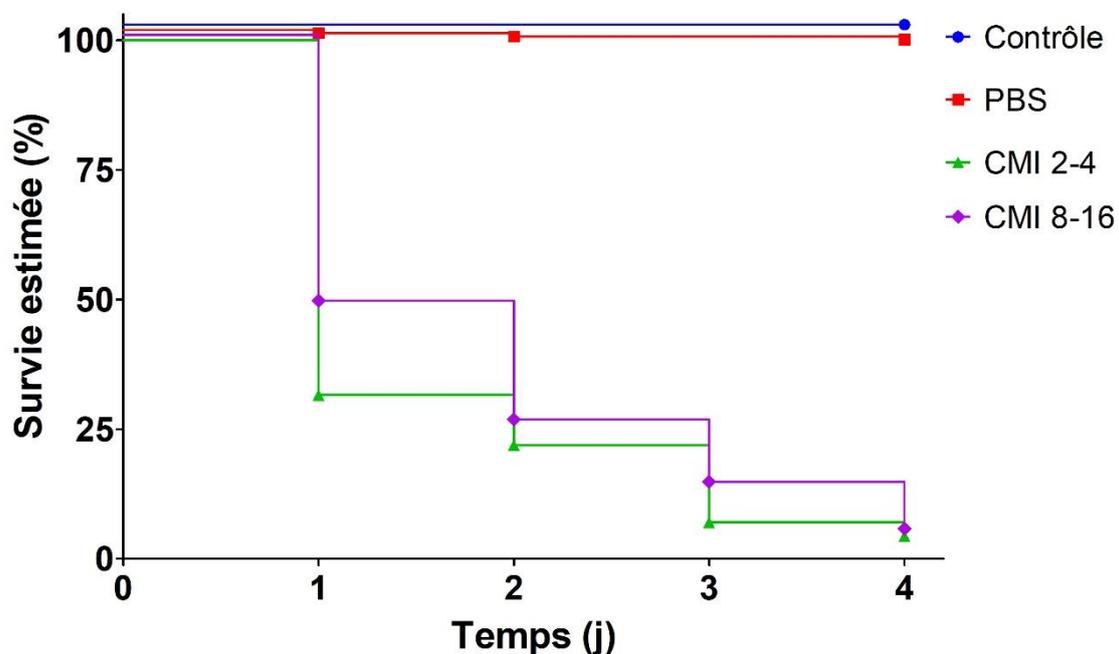


Figure 27 : Courbes de survie de groupes de larves de *G. mellonella* inoculées avec des souches de FSSC réparties selon leurs concentrations minimales inhibitrices au voriconazole (CMI)

(contrôle : larves non infectées, PBS : larves non infectées avec injection de PBS, CMI 2-4 : larves infectées par des souches FSSC à CMI faible, CMI 8-16 : larves infectées avec des souches à CMI élevée). Les données de deux réplicats biologiques ont été regroupées. Nombre de larves = 112, 160, 114, 166 respectivement pour les conditions contrôle, PBS, CMI 2-4 et CMI 8-16

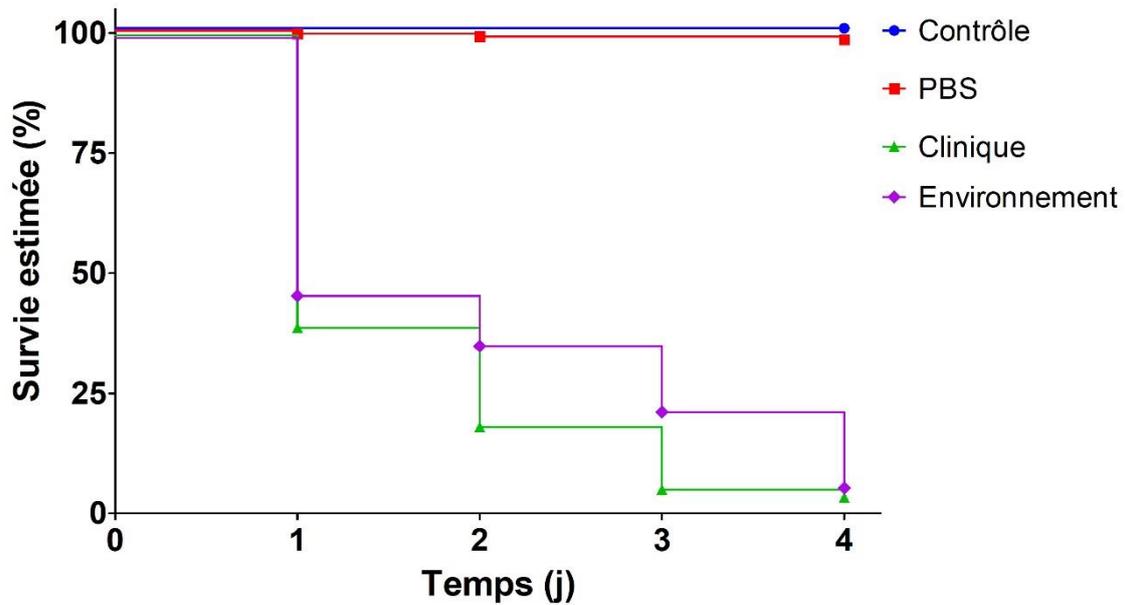


Figure 28 : Courbes de survie de groupes de larves de *G. mellonella* inoculées avec des souches de FSSC réparties selon leurs origines cliniques ou environnementales

(contrôle : larves non infectées, PBS : larves non infectées avec injection de PBS, clinique : larves infectées par des souches FSSC isolés en clinique, environnement : larves infectées avec des souches FSSC isolées de l'environnement). Nombre de larves = 112, 160, 184, 95 respectivement pour les conditions contrôle, PBS, clinique et environnement

#### 4.2.3. Description anatomopathologique de l'infection à *Fusarium* chez *Galleria mellonella*

L'analyse histopathologique a révélé l'infection invasive chez les larves non traitées infectées par la souche de *Fusarium* FSSC86. Après coupe sagittale de la larve infectée, la coloration de Gomori-Grocott met en évidence dans différentes zones tissulaires de la larve des filaments septés ainsi que des spores en cours de germination (Figure 29). L'infection est disséminée dans différentes parties des larves. La coloration à l'Hémalun-Eosine-Safran (HES) permet également d'observer des éléments fongiques au sein du granulome avec différentes cellules mononucléées.

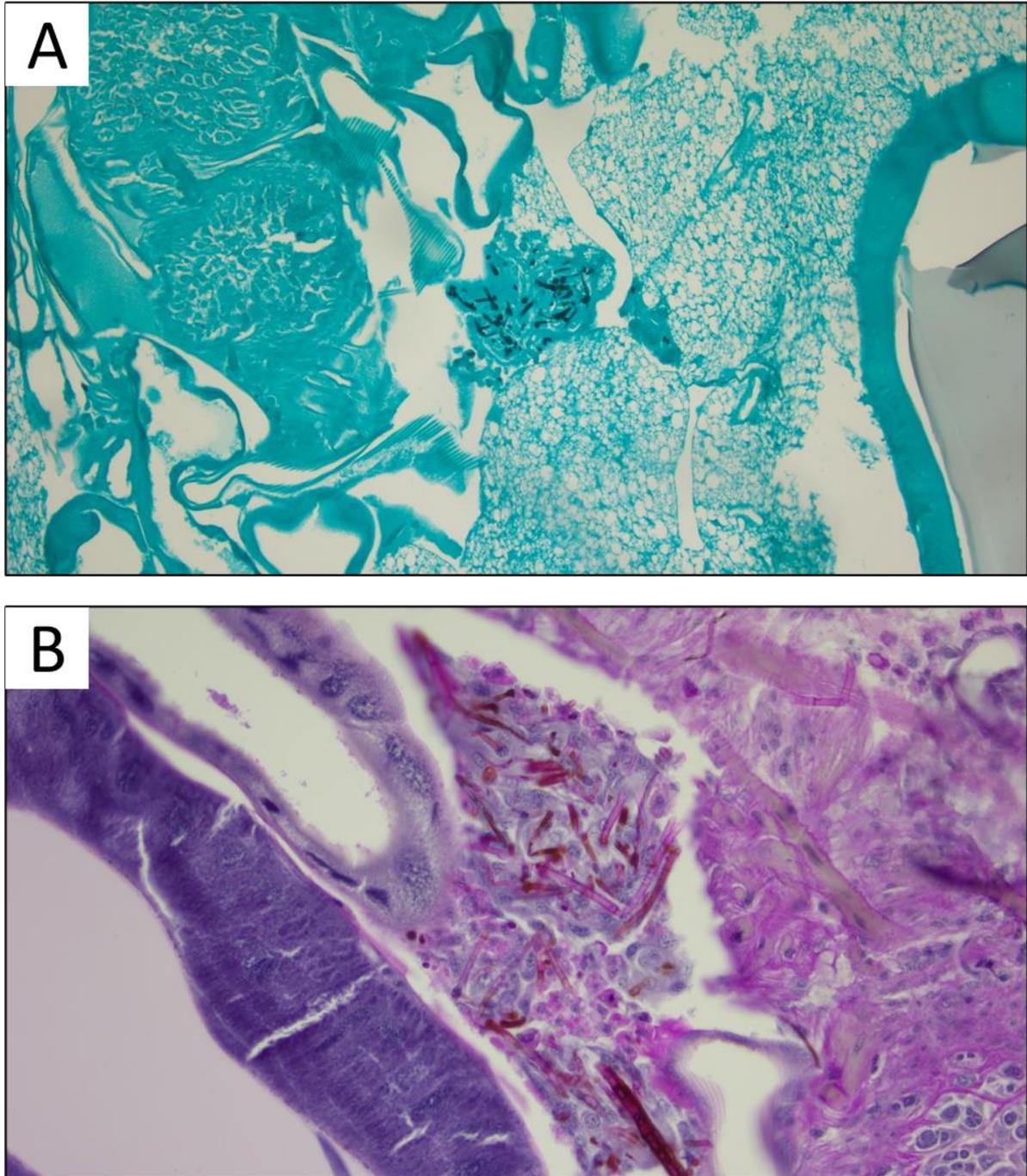


Figure 29 : Histopathologie de larves de *Galleria mellonella* infectées par la souche FSSC86 24 heures après inoculation. Les larves n'ont pas été traitées par du voriconazole. Observation de filaments septés et spores en cours de germination (coupe sagittale après coloration de Gomori-Grocott (A) et à l'Hémalun-Eosine-Safran HES (B))

#### 4.2.4. Etude de la sensibilité aux antifongiques *in vivo* dans le modèle *Galleria mellonella*

Pour chaque souche testée, les larves infectées ont été traitées avec 64 µg de VRZ, 2 heures après l'infection. Dans les groupes témoins de larves non infectées ayant subi une injection de PBS ou une injection de VRZ, la mortalité était de 6 et 14 % respectivement, sans différence significative selon le test de Log-rank (risque alpha 0,05).

Les résultats montrent une différence significative ( $p=0,02$ ) dans la survie moyenne entre les larves infectées non traitées et celles infectées et traitées par VRZ. Le groupe non traité présente un taux de survie à 9 % au 4<sup>ème</sup> jour, contre 5 % pour le groupe traité (Figure 30). Ces données sont en opposition avec le principe de traitement, l'utilisation de voriconazole favorisant la mort des larves infectées.

La comparaison des souches en fonction de leurs CMI n'a pas montré de différence significative entre les groupes de larves infectées traitées ou non (Figure 31). Le taux de mortalité au 4<sup>ème</sup> jour était respectivement de 91 % et 94 % pour le groupe de larves infectées par des souches présentant une CMI entre 2 et 4 µg/mL ( $p=0,2$ ). Concernant le groupe avec CMI compris entre 8 et 16 µg/mL, la mortalité au 4<sup>ème</sup> jour était de 91 % pour le groupe non traité et 96 % pour le groupe traité ( $p=0,06$ ).

Les résultats obtenus sur modèle *in vivo* avec *G. mellonella* ne montrent pas de bénéfice d'un traitement par voriconazole lors d'une infection à *Fusarium*, et ce quel que soit le profil de sensibilité de la souche vis-à-vis de l'antifongique.

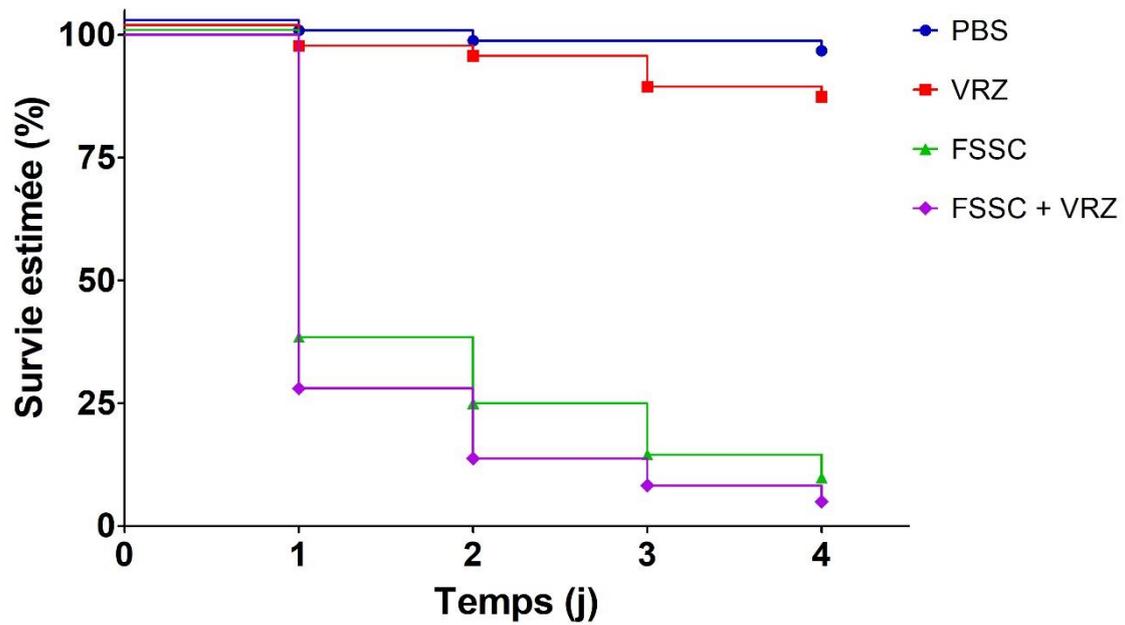


Figure 30 : Courbes de survie de larves de *G. mellonella* infectées par les souches de FSSC et traitées avec 64 µg/larve de voriconazole 2 h après l'infection

(PBS : larves après injection de PBS, VRZ : larves non infectées et traitées par voriconazole (64 µg/larve), FSSC : larves infectées et non traitées, FSSC + VRZ : larves infectées et traitées par voriconazole (64 µg/larve). Nombre de larves = 48 pour PBS et VRZ, 192 pour FSSC et 182 pour FSSC + VRZ)

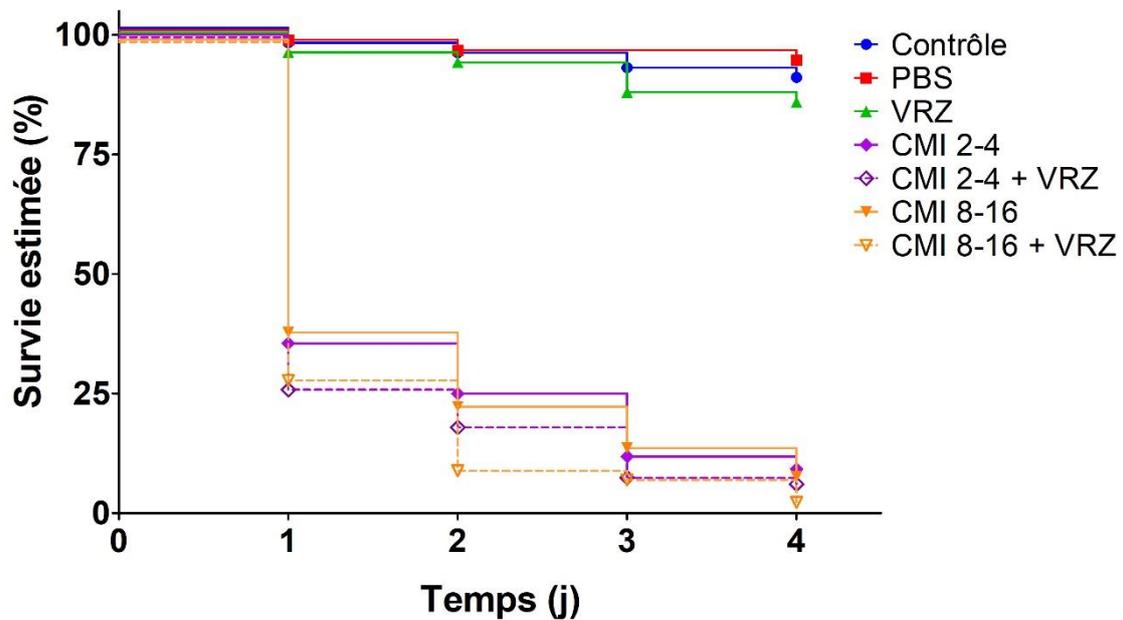


Figure 31 : Courbes de survie de groupes de larves de *G. mellonella* infectées par les souches de FSSC réparties selon leurs concentrations minimales inhibitrices au voriconazole (CMI) et traitées avec 64 µg/larve de voriconazole 2 h après l'infection

(Contrôle : larves non infectées, PBS : larves après injection de PBS, VRZ : larves après injection de voriconazole (64 µg/larve), CMI 2-4 : larves infectées par des souches FSSC à CMI faible et non traitées, CMI 2-4 + VRZ : larves infectées par des souches FSSC à CMI faible et traitées par voriconazole (64 µg/larve), CMI 8-16 : larves infectées avec des souches à CMI élevée et non traitées, CMI 8-16 + VRZ : larves infectées par des souches FSSC à CMI élevée et traitées par voriconazole (64 µg/larve). Nombre de larves = 96 pour les contrôles, 48 pour les groupes PBS et VRZ 76 pour les 2 groupes CMI 2-4, 116 et 106 respectivement pour les groupes CMI 8-16 non traitées et traitées)

### 4.3. Discussion

Il a été clairement établi que la résistance vis-à-vis d'agents anti-infectieux entraînait un coût d'adaptation chez les microorganismes comme les bactéries. Ce « fitness cost » peut se traduire par une croissance plus longue ou des difficultés d'adaptation à certains milieux nutritifs. Cependant, ces constats ne sont pas toujours observés chez les filamenteux. Les résultats présentés précédemment montrent qu'en l'absence d'exposition à un antifongique, les souches de *Fusarium solani* possèdent un profil de croissance spécifique mais comparables quelle que soit la valeur de CMI au voriconazole. Les mêmes constats ont été observés dans une étude sur *Fusarium graminearum*. Bien que certains mutants présentaient un développement mycélien réduit de 50 %, signe d'un coût d'adaptation du champignon, la plupart des mutants possédait une pathogénicité identique à celle de leurs isolats parentaux [241].

Une étude utilisant le modèle invertébré *G. mellonella* a montré que la virulence du genre *Fusarium* était dépendante de nombreux facteurs. La température d'incubation des larves infectées a un impact sur la rapidité de la mortalité, les isolats étant létales plus rapidement à 30°C que celles incubées à 37°C. En plus de la température, la virulence dépend de la souche de *Fusarium* en elle-même, de l'inoculum injecté et de la morphologie des conidies, les macroconidies étant plus virulentes.

Peu d'études se sont intéressées à l'heure actuelle au « fitness cost » chez le complexe d'espèces *Fusarium solani*. Cependant, certains travaux sur *Aspergillus fumigatus* ont rapporté les mêmes observations. Les équipes de Valsecchi *et al.*, et Gomez-Lopez *et al.*, ont montré que les capacités de croissance et la conidiogénèse des souches d'*A. fumigatus* résistantes aux azolés étaient similaires à celles des souches parentales ou sensibles aux azolés. Ces données suggèrent l'absence de « fitness cost » négatif *in vitro* chez des souches d'*A. fumigatus* résistantes aux azolés. Valsecchi *et al.* ont également pu constater les mêmes observations dans un modèle murin *in vivo* [229,242].

Un modèle mimant une fusariose invasive *in vivo* a été réalisé en utilisant la larve de *Galleria mellonella* pour évaluer la virulence de *Fusarium* et l'efficacité du voriconazole *in vivo*. Ce modèle a déjà été décrit dans la littérature et utilisé pour l'étude de l'aspergillose invasive [231–233,242]. Tout comme les résultats de virulence obtenus avec *Fusarium solani*, l'acquisition de mécanismes de résistance aux azolés ne semble pas avoir d'impact sur la virulence chez *A. fumigatus*. En effet, aucune différence significative n'a pu être mise en évidence dans la survie moyenne entre les larves infectées par la souche de type sauvage et celles infectées par les souches résistantes, quelles que soient les modifications au niveau du gène *CYP51A*. Il a également été montré une augmentation progressive de la charge d'*Aspergillus* pendant la durée de l'infection par biologie moléculaire. La charge fongique, après 72h d'infection, variait de 27,7 à 53,9 ng d'ADN par gramme de larve, sans différence statistiquement significative entre les souches mutantes et celle de type sauvage [242]. L'équipe de Jemel a également montré que la pathogénicité de 3 isolats cliniques d'*A. fumigatus* de profils de sensibilité différents au voriconazole était strictement identique pour un même inoculum infectant [232].

Les résultats de notre étude ont montré qu'une souche FSSC isolée d'un prélèvement clinique présentait une virulence accrue par rapport à une souche issue de l'environnement. Des données similaires ont été observées dans une étude sur *A. fumigatus* utilisant un autre modèle d'évaluation de la virulence [243]. Cependant, l'équipe de Coleman a également étudié la

virulence de *Fusarium* grâce au modèle *in vivo* de *Galleria mellonella*. Les auteurs concluent que la virulence des souches de *Fusarium* spp. étudiées était similaire, quelle que soit l'origine de l'isolat, clinique ou environnementale [48].

En plus de l'étude de la pathogénicité *in vivo*, l'utilisation des larves de *G. mellonella* peut également être étendue au suivi des effets des antifongiques lors d'infections [244]. La présente étude n'a pas montré le bénéfice d'un traitement par voriconazole pour des larves infectées par *Fusarium solani*, que l'isolat présente une CMI au voriconazole élevé ou faible. L'analyse statistique tend à montrer une mortalité plus élevée dans le groupe traité par voriconazole. À l'opposé, plusieurs études sur *A. fumigatus* ont confirmé l'effet antifongique des molécules actuellement utilisées en thérapeutique humaine grâce au modèle *G. mellonella*. Ainsi, l'administration de l'amphotéricine B entraîne une réduction de la mortalité des larves de manière dose-dépendante, avec un taux de survie de 90 % contre moins de 10 % pour les témoins non traités dans certaines études [232,245]. L'effet du voriconazole a également été étudié et a montré, pour une dose donnée, une efficacité plus importante chez les larves infectées par des isolats sensibles au voriconazole. Des doses plus importantes de voriconazole, parfois supérieures à celles utilisées chez l'homme, devaient être employées afin d'améliorer le temps de survie des larves infectées par des souches résistantes à l'antifongique [232,246,247].

Les lésions fongiques observées chez *G. mellonella* correspondent à une infection de type granulome. Bien que disséminés sur l'ensemble de la larve, des grains, constitués de matériel fongique et de cellules nucléées, ont été observés au microscope. Le monitoring de l'étendue de l'infection à *Fusarium* est donc difficilement réalisable par des ponctions d'haemocèle. L'utilisation de broyats tissulaires de larve permettrait une exploration plus précise. De plus, l'infection de larve par une souche exprimant une protéine fluorescente pourrait être une approche intéressante. En effet, Navaro *et al*, a utilisé des souches de *Fusarium oxysporum* exprimant la protéine fluorescente verte ou GFP (Green Fluorescent Protein). L'infection de larve de *G. mellonella* par ces souches a permis de suivre l'évolution et le développement du champignon au cours du temps. Une fois la larve morte, une colonisation entière du corps a été observé avec une production d'hyphes aériens émergeant des ouvertures [248].

## 5. MODIFICATION QUALITATIVE DE LA CIBLE

### 5.1. Matériels et méthodes

#### 5.1.1. Amplification et séquençage des gènes *CYP51A*, *B* et *C*

Après extraction de l'ADN grâce au kit Monarch Genomic DNA Purification (New England Biolabs® Inc., Ipswich, MA, Etats-Unis), les gènes *CYP51A*, *CYP51B* et *CYP51C* ont été amplifiés grâce au kit Taq'Ozyme Purple Mix 2 (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France) en utilisant des amorces décrites dans l'article de James, *et al* [249]. Leurs séquences sont présentées dans le Tableau 7. Le séquençage selon la méthode Sanger a été réalisé par la société EurofinsGenomics.

Tableau 7 : Amorces utilisées pour amplifier les gènes *CYP51A*, *CYP51B* et *CYP51C*

Désignation	Séquence (5'-3')
CYP51A-F1	ATCGCAAACAGCCAACTGGA
CYP51A-F2	TAAAAGCCCTCCGTGTTCCCTC
CYP51A-R1	GTGCAACCCATCAAGTTGGC
CYP51A-R2	TCTAGAATGCCAATAGTAGA
CYP51B-F1	GCTCTCAACAGCAACAACCTTCTAC
CYP51B-F2	AGCCCATGATAGTTCATGAAGATCG
CYP51B-R	TCCAAGACACACATCATCTCATTCC
CYP51C-F1	AAACGAATGATGCTGACAGTCTGAC
CYP51C-F2	TCACCATCTACACCGCTCCGGCTC
CYP51C-R	CGGCGAGAGGTTCAATTCCGATTAG

#### 5.1.2. Analyse bioinformatique

Les analyses de séquences et leurs alignements ont été réalisés grâce au logiciel Geneious Prime® (Geneious v2021.1) et comparés aux bases de données NCBI BLAST [250]. Les séquences obtenues ont été comparées à celles décrites pour la souche *Fusarium vanettenii* mpVI 77-13-4 (Tableau 8). Les ARNm de différentes souches ont été obtenus par alignement des séquences SANGER vis-à-vis des séquences ARNm de *CYP51A*, *CYP51B*, et *CYP51C* de *Fusarium vanettenii* mpVI 77-13-4 (Tableau 8).

Une fois l'épissage réalisé, les séquences ARNm des souches sont traduites et les séquences protéiques obtenues sont alignées et comparées entre elles *via* le logiciel Geneious Prime®.

Tableau 8 : Références des gènes et ARNms de *Fusarium vanettenii* mpVI 77-13-4 utilisés dans cette étude

Isoformes	Gène	ARNm
CYP51A	NECHADRAFT_43488 (1583 bp)	XM_003045158.1 (1521 bp)
CYP51B	NECHADRAFT_57370 (1965 bp)	XM_003054190.1 (1802 bp)
CYP51C	NECHADRAFT_41888 (1649 bp)	XM_003051375.1 (1551 bp)

Différents profils protéiques ont été identifiés et deux protéines étaient considérées comme appartenant à un même profil si le pourcentage de similarité était  $\geq 99$  %.

### 5.1.3. Comparaison des mutations des protéines CYP51A, B et C

Les positions des mutations des protéines CYP51A et CYP51B ont été comparées à celles associées à une résistance aux azolés chez *Aspergillus fumigatus* NRRL:163 (souche de référence WT) [204]. *A. fumigatus* ne possède pas de troisième isoforme CYP51. Cependant, CYP51C est présent chez *Aspergillus flavus* NRRL3357 (souche de référence WT) et des mutations associées à la résistance aux azolés ont été décrites malgré des données controversées dans la littérature [251–253]. L'ensemble des informations des souches de référence utilisées est résumé dans le Tableau 9.

Tableau 9 : Références des séquences protéiques CYP51A, B et C des souches d'*Aspergillus* sp. utilisées dans nos comparaisons

Protéine	Génome	Référence
CYP51A	<i>Aspergillus fumigatus</i> NRRL:163	AAK73659
CYP51B		
CYP51C	<i>Aspergillus flavus</i> NRRL3357	QRD94494

#### 5.1.4. Comparaison avec d'autres complexes d'espèces de *Fusarium*

Les séquences protéiques CYP51A de notre panel de souches FSSC ont été comparées à d'autres complexes d'espèces du genre *Fusarium*. Des souches environnementales et cliniques d'autres complexes d'espèces de *Fusarium* connues pour être pathogènes chez l'Homme ou les plantes ont été sélectionnées (Tableau 10). Cette comparaison a été réalisée afin de mettre en évidence les mutations ponctuelles partagées qui pourraient expliquer la variabilité de la sensibilité au voriconazole au niveau du complexe ou du genre.

Tableau 10 : Références des séquences protéiques CYP51A des complexes d'espèce de *Fusarium* utilisées pour nos comparaisons

Complexe d'espèces	Génome	Référence
<i>Fusarium solani</i>	<i>Fusarium falciforme</i>	QGZ00344.1
	<i>Fusarium floridanum</i>	RSL78044.1
	<i>Fusarium keratoplasticum</i>	QGR26268.1
	<i>Fusarium suttonianum</i>	QGZ00346.1
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium odoratissimum</i> NRRL 54006	XP_031067647.1
	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersicum</i> 4287	XP_018249823.1
<i>Fusarium fujikuroi</i>	<i>Fusarium denticulatum</i>	KAF5688222.1
	<i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289	XP_023435732.1
	<i>Fusarium proliferatum</i> ET1	XP_031088172.1
	<i>Fusarium verticillioides</i> 7600	XP_018757407
<i>Fusarium sambucinum</i>	<i>Fusarium graminearum</i> PH-1	XP_011321548.1
	<i>Fusarium pseudograminearum</i> CS3096	XP_009251504.1

#### 5.1.5. Modélisation de la protéine CYP51A

En partenariat avec le Dr A. Gruez (équipe d'Ingénierie Moléculaire et Physiopathologie Articulaire (IMoPA), Université de Lorraine), la structure d'homologie tridimensionnelle (3D) de la protéine FSSC CYP51A a été modélisée grâce au serveur I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER>) [254,255], en utilisant *Fusarium vanettenii* mpVI 77-13-4 comme séquence de requête. La structure cristalline de la lanostérol 14-alpha déméthylase (PDB ID 5eqb) partageant une séquence identique à 45,1 % et un score TM de 0,984 (couverture de 99 %) a été utilisée comme modèle pour la modélisation. Les figures ont été réalisées à l'aide du système graphique moléculaire PyMOL, v2.5.2.

## 5.2. Résultats

### 5.2.1. Profils protéiques de CYP51A, B et C

L'analyse des séquences protéiques des CYP pour les 17 souches de FSSC révèle respectivement 54, 23 et 29 mutations pour CYP51A, B et C. La comparaison des séquences protéiques met en évidence 9 profils pour CYP51A (1a à 9a), 4 profils pour CYP51B (1b à 4b) et 5 profils pour CYP51C (1c à 5c) (Tableau 11). La distribution des différentes souches de FSSC selon leurs CMI au VRZ révèle un lien entre CMI et séquences protéiques. En effet, les souches présentant une faible CMI au VRZ partagent le même profil, à l'exception de FSSC20 et FSSC99 qui présentent une CMI VRZ différente d'une dilution.

Tableau 11 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) des souches FSSC pour les antifongiques azolés

(voriconazole VRZ, itraconazole ITZ, posaconazole PSZ, isavuconazole IVZ) et profils d'homologie des CYP51A, B et C pour chaque souche FSSC (ND : données non disponibles). Les souches étudiées sont classées par ordre croissant de CMI VRZ. Chaque séquence protéique de CYP51A, B et C a été comparée entre les différentes souches FSSC et les homologies observées sont utilisées pour définir les profils. Deux souches partagent le même profil lorsque leurs séquences protéiques présentent plus de 99 % de similarité. Les profils sont notés avec un chiffre et une lettre correspondant à l'isoforme. Les nombres ont été choisis arbitrairement en fonction de l'ordre des souches par rapport à la CMI au VRZ. Pour chaque isoforme de CYP51, le gradient de couleur correspond à la proximité des profils protéiques entre eux (du vert au rouge)

Souches	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )				Profils		
	VRZ	ITZ	PSZ	IVZ	CYP51A	CYP51B	CYP51C
FSSC20	2	>16	8	16	3a	2b	2c
FSSC102	2	>16	>16	8	1a	1b	ND
FSSC111	2	>16	>16	4	1a	1b	1c
FSSC112	2	>16	>16	4	1a	ND	1c
FSSC45	4	>16	>16	16	2a	2b	2c
FSSC98	4	>16	>16	16	4a	3b	3c
FSSC99	4	>16	>16	8	1a	1b	1c
FSSC115	4	>16	>16	4	7a	4b	5c
FSSC21	8	>16	>16	16	5a	4b	ND
FSSC25	8	>16	>16	16	8a	4b	4c
FSSC29	8	>16	>16	16	2a	4b	2c
FSSC36	8	>16	>16	32	4a	3b	3c
FSSC86	8	>16	>16	16	6a	4b	4c
FSSC90	8	>16	>16	8	4a	3b	ND
FSSC118	8	>16	>16	16	5a	4b	4c
FSSC121	8	>16	>16	16	8a	4b	4c
FSSC47	16	>16	>16	64	9a	3b	3c

### 5.2.2. Comparaison des mutations des protéines CYP51A, B et C

Seules 5 des 23 mutations (position 22, 172, 220, 255 et 427) décrites chez *A. fumigatus* comme étant associées à une résistance aux azolés sont retrouvées dans notre panel de souches de FSSC (Tableau 12). Les mutations en positions 22, 220, 255 et 427 chez les souches FSSC sont différentes de celles observées chez la souche *A. fumigatus* de type sauvage (*Af* WT) et celle résistant aux azolés (*Af* R). À l'opposé, la mutation en position 172 est différente de celle retrouvée chez *Af* WT mais identique à celle identifiée chez *Af* R. Toutes les souches FSSC partagent ces mutations induisant les mêmes changements d'acides aminés.

Tableau 12 : Comparaison des modifications d'acides aminés de CYP51A observés chez nos souches FSSC avec celles associés à une résistance aux azolés chez *A. fumigatus*

(vert : mutations ponctuelles différentes d'*A. fumigatus* type sauvage (WT) et muté (azolé R); orange : mutation ponctuelle différente de WT mais identique à azolé R)

<i>Aspergillus fumigatus</i>			Complexe d'espèces <i>Fusarium solani</i>			
Position	Acide aminé		Position	Acide aminé	Souches	
	WT	Azolé R				
22	N	D	22	H	Toutes	
46	F	Y	46	F	Toutes	
52	S	T	52	S	Toutes	
54	G	E,K,R,V,W	54	G	Toutes	
98	L	H	98	L	Toutes	
121	Y	F	121	Y	Toutes	
138	G	C,R	138	G	Toutes	
141	Q	H	141	Q	Toutes	
147	H	Y	147	H	Toutes	
172	M	V	170	V	Toutes	
216	P	L	214	P	Toutes	
220	M	K, I, T, V	218	L	Toutes	
248	N	T	246	N	Toutes	
255	D	E	253	G	Toutes	
289	T	A	287	T	Toutes	
297	S	T	295	S	Toutes	
394	P	L	389	P	Toutes	
427	E	G,K	422	D	Toutes	
431	Y	C	426	Y	Toutes	
434	G	C	429	G	Toutes	
440	T	A	435	T	Toutes	
448	G	S	443	G	Toutes	
491	Y	H	486	Y	Toutes	
495	F	I	490	F	Toutes	

Le même processus a été appliqué pour le CYP51B. Aucune des 4 mutations décrites chez *A. fumigatus* n'est observée dans le panel de souches de FSSC étudiées. À ces positions, les souches FSSC partagent le même acide aminé que celui décrit dans la souche de référence *A. fumigatus* WT.

Seules deux mutations de CYP51C ont été décrites et associées à la résistance d'*Aspergillus flavus* aux azolés. En position 240 (249 pour FSSC), toutes les souches de FSSC présentent un acide aminé (G) différent de *A. flavus* de type sauvage WT (S) ou résistant aux azolés (A). Concernant la deuxième mutation, les souches FSSC partagent le même acide aminé que celui décrit pour la souche de référence *A. flavus* WT.

### 5.2.3. Modélisation de la protéine CYP51A

Les cinq mutations communes à toutes les souches de FSSC et impliquées dans la résistance aux azolés d'*A. fumigatus* ont été mises en évidence dans le modèle tridimensionnel de CYP51A afin d'évaluer leur impact sur la 14 $\alpha$ -déméthylase (Figure 32). Les acides aminés aux positions 22, 170, 253 et 422 ne se situent pas près du site actif ni près du canal d'entrée du substrat mais à la surface de la protéine.

La chaîne latérale de H22 interagit avec une crevasse formée par les résidus W41 (tryptophane), L42 (leucine) et P43 (proline) qui sont localisés dans la boucle avant la courte hélice  $\alpha$ A' selon la nomenclature CYP. Cette hélice se situe au niveau de l'entrée du canal du substrat. En conséquence, la mutation en position 22 peut influencer le positionnement de l'hélice  $\alpha$ A' et remodeler la surface de l'entrée du canal. Cette modification pourrait induire, selon l'interaction et la taille de l'azolé, une discrimination de l'azolé, voire interdire l'accès de l'azolé au site actif par encombrement stérique. Celui-ci pourrait bloquer l'entrée du site actif contre la membrane.

Concernant les mutations ponctuelles en position 170, 253 et 422, elles sont situées respectivement au niveau des boucles  $\beta$ 31,  $\alpha$ G- $\alpha$ H, et  $\alpha$ K'- $\alpha$ L. Leurs impacts sur l'interaction enzyme-azolé est inconnue et nécessite d'autres études plus approfondies.

L'acide aminé L218 (leucine) interagit avec l'acide aminé F75 (phénylalanine). Les deux se situent à l'entrée du canal pour le substrat de CYP51A (soit à proximité immédiate de

l'itraconazole modélisé) (Figure 32). En conséquence, la position 218 pourrait être impliquée dans l'interaction entre l'enzyme et ses substrats.

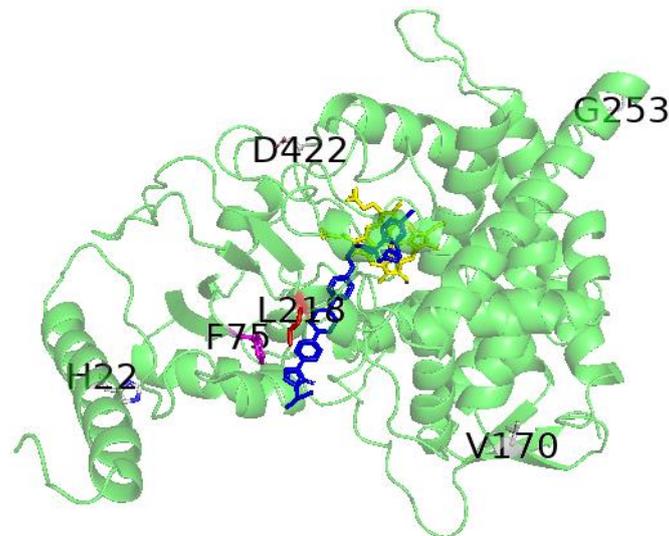


Figure 32 : Modèle conformationnel de la protéine CYP51A de FSSC.

Les mutations ponctuelles partagées par toutes les souches FSSC et connues pour être associées à une résistance aux azolés chez *A. fumigatus* sont indiquées par la lettre et la position de l'acide aminé. L'acide aminé L218 interagit avec F75, les deux sont présents à l'entrée du canal du substrat (jaune : hème; bleu : itraconazole; violet : F75; rouge : L218)

Les propriétés physicochimiques des acides aminés observées dans les 5 mutations d'intérêt (positions 22, 170, 218, 253 et 422 dans les souches FSSC) ont été comparées à celles décrites chez *A. fumigatus* (Tableau 13).

Comme décrit dans la littérature, des mutations de CYP51A en position 220 du résidu M (méthionine) en autres résidus I (isoleucine), K (lysine), T (thréonine) ou V (valine) sont associées à une résistance aux azolés chez *A. fumigatus*. Chez FSSC, l'acide aminé en position équivalente est une leucine (L218). Ce résidu est structurellement très proche de l'isoleucine et est présent chez toutes nos souches FSSC (Figure 33).

Tableau 13 : Mutations d'intérêt de CYP51A observées chez les souches FSSC et les souches d'*Aspergillus fumigatus* résistants aux azolés

(**A** : apolaire; **P** : polaire non chargé, **-** : polaire chargé négativement; **+** : polaire chargé positivement; VRZ : voriconazole, ITZ : itraconazole, PSZ : posaconazole, ATU (area of technical uncertainty) : zone d'incertitude technique, R: résistant, ND : données non disponibles, V : variable)

<i>Aspergillus fumigatus</i>			Complexe d'espèces <i>Fusarium solani</i>				
Position	WT	Mutant	Résistance aux azolés <sup>1</sup>			Position	Acide aminé
			VRZ	ITZ	PSZ		
22	<b>Asn (P)</b>	<b>Asp (-)</b>	ND	R	ND	22	<b>His (+)</b>
172	<b>Met (A)</b>	<b>Val (A)</b>	R	R	V	170	<b>Val (A)</b>
220	<b>Met (A)</b>	<b>Lys (+)</b> <b>Ile / Val (A)</b> <b>Thr (P)</b>	ATU/R	R	R	218	<b>Leu (A)</b>
255	<b>Asp (-)</b>	<b>Glu (-)</b>	R	R	ATU	253	<b>Gly (A)</b>
427	<b>Glu (-)</b>	<b>Gly (A)</b> <b>Lys (+)</b>	R	R	V	422	<b>Asp (-)</b>

<sup>1</sup> Résistance aux azolés décrites dans la littérature [204,256]

**Asn** : asparagine, **Asp** : acide aspartique, **Glu** : acide glutamique, **Gly** : glycine, **His** : histidine, **Ile** : isoleucine, **Leu** : leucine, **Lys** : lysine, **Met** : méthionine, **Thr** : thréonine, **Val** : valine

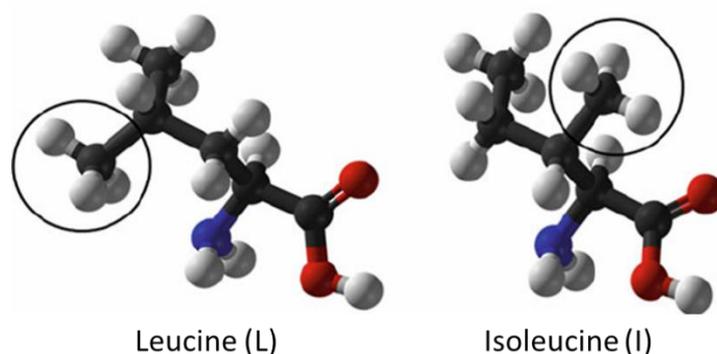


Figure 33 : Représentation tridimensionnelle des acides aminés leucine (L) et isoleucine (I) (d'après Berntson et Cacioppo, 2012 [257])

Les deux acides aminés sont composés des mêmes éléments dans les mêmes proportions (C<sub>6</sub>H<sub>13</sub>NO<sub>2</sub>). La différence se retrouve au niveau de l'emplacement du groupe méthyle (cercle noir) (**blanc** : atome d'hydrogène, **rouge** : atome d'oxygène, **noir** : atome de carbone, **bleu** : atome d'azote).

Les différentes souches de FSSC étudiées ont été classées précédemment selon leur profil protéique de CYP51A. Un lien entre CMI et profil protéique semble exister. Afin d'évaluer l'impact des autres mutations présentes dans le panel de souches évaluées, leurs positions respectives et leurs situations spatiales au niveau du modèle tridimensionnel ont été répertoriées.

Au total, 54 points de mutation ont été observés entre les différentes souches (Tableau 14). La majorité des différences d'acides aminés entre souche se situait en périphérie de la protéine. La position 151 montre une grande disparité au sein des souches. Cependant, l'acide aminé en position 151 se situe au niveau de la périphérie de la protéine. Certains points de mutation (6 sur 54) se trouvaient à proximité du canal d'entrée du substrat.

Cependant, la répartition des acides aminés sur ces 6 points de mutation ne semble pas mettre en évidence une corrélation entre acide aminé et CMI de la souche. En effet, les souches de CMI faible (2 µg/mL) partagent le même acide aminé pour les positions 388, 390, 463. Aucune différence n'a été observée entre les autres souches présentant pourtant des CMI allant de 4 à 16 µg/mL. Les acides aminés des points de mutation situés en position 42, 45 et 385 sont partagés par l'ensemble des souches, à l'exception de la souche FSSC99 pour les positions 42 et 45. La souche FSSC47 ayant une CMI au voriconazole à 16 µg/mL ne présente aucune particularité au niveau des différents points de mutation par rapport à d'autres souches plus sensibles, à l'exception du point de mutation en position 385. Il s'agit de la seule souche avec une valine (V) au lieu d'une isoleucine (I).

## Deuxième Partie : Mécanismes de Résistance aux Azolés chez FSSC

Tableau 14 : P. Points de mutation des souches FSSC étudiées selon leurs concentrations minimales inhibitrices (CMI) au voriconazole et localisation de l'acide aminé par rapport à l'entrée du canal du substrat (disparité : pourcentage de différence entre l'acide aminé de la souche et celui de la séquence consensus, périphérie : acide aminé en périphérie de la protéine et du canal d'entrée, proximité : acide aminé proche du canal d'entrée)

CMI (µg/ml)	2	2	2	4	4	4	4	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	15	16	Disparité	Consensus	Localisation AA	
Position	FSSC20	FSSC102	FSSC111	FSSC112	FSSC45	FSSC98	FSSC99	FSSC115	FSSC21	FSSC25	FSSC29	FSSC36	FSSC86	FSSC90	FSSC118	FSSC121	FSSC47	FSSC121	FSSC121	FSSC121	FSSC121	FSSC47	FSSC47	FSSC47	FSSC47
3	S	.	.	S	.	.	.	L	L	L	S	.	S	.	L	L	.	L	L	L	L	.	T	Périphérie	
6	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	A	.	A	V	V	A	.	S	Périphérie	
11	.	.	.	.	.	.	.	.	V	V	.	.	.	.	.	V	.	V	V	V	V	.	A	Périphérie	
12	.	.	.	.	.	.	.	.	L	L	.	.	L	.	.	L	.	L	L	L	L	.	I	Périphérie	
13	A	.	.	A	A	A	.	.	.	A	A	A	.	A	.	.	.	.	.	.	.	G	G	Périphérie	
20	I	.	.	I	I	I	.	I	I	I	I	.	.	V	I	.	.	.	.	.	.	L	A	Périphérie	
23	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	A	Périphérie
27	N	.	.	N	.	.	.	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	K	Périphérie
28	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	L	Périphérie
33	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	Périphérie	
38	.	.	.	.	.	.	.	I	I	I	.	I	I	.	I	I	.	.	.	.	.	V	V	Périphérie	
42	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	L	Proximité
45	.	F	F	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	I	Proximité
56	.	R	R	.	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	Périphérie
61	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	K	Périphérie
62	Y	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	C	Périphérie
140	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	K	K	Périphérie
151	H	S	S	H	H	H	S	R	R	R	H	H	R	H	R	R	H	R	R	R	H	H	-	100%	Périphérie
157	.	T	T	.	.	.	T	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	I	Périphérie
160	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	V	V	Périphérie
166	.	.	.	.	.	.	.	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	S	Périphérie
172	.	V	V	V	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	I	Périphérie
174	.	S	S	S	.	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	N	Périphérie
203	.	D	D	D	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	Périphérie
232	.	T	T	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	Périphérie
257	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	E	E	Périphérie
258	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	Y	Y	Périphérie
267	.	.	.	.	.	S	.	.	.	.	.	S	.	S	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	Périphérie
269	.	.	.	.	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	Périphérie
323	.	.	.	I	.	.	.	H	H	.	.	.	H	.	H	.	.	.	.	.	.	.	Y	Y	Périphérie
330	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	Périphérie
339	.	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	L	L	Périphérie
340	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	G	.	N	.	.	.	.	D	D	Périphérie	
343	.	.	F	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	S	Périphérie
372	.	P	P	P	.	.	P	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	Périphérie
376	.	.	.	.	.	.	.	H	.	.	.	H	.	.	H	.	.	.	.	.	.	.	Q	Q	Périphérie
385	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	I	I	Proximité
388	.	A	A	A	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	S	S	Proximité
390	.	I	I	I	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	T	Proximité
396	.	.	.	.	.	.	.	D	.	D	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	E	E	Périphérie
401	.	.	D	D	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	N	Périphérie
403	.	.	.	.	.	.	.	K	.	.	.	.	K	.	K	.	.	.	.	.	.	.	R	R	Périphérie
404	.	.	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	T	T	Périphérie
406	.	.	N	N	.	.	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	D	D	Périphérie
412	.	.	.	.	.	.	.	D	.	.	.	.	D	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	N	Périphérie
414	.	.	.	.	A	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	V	Périphérie
418	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	V	Périphérie
419	.	T	T	T	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	Périphérie
420	.	A	A	A	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	G	Périphérie
463	.	I	I	I	.	.	I	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	V	Proximité
466	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	M	M	Périphérie
467	.	.	.	.	.	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	V	V	Périphérie
469	.	.	.	.	.	.	.	M	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	N	N	Périphérie
506	.	.	.	E	.	.	E	.	.	.	.	E	.	E	.	.	.	.	.	.	.	.	A	A	Périphérie

#### 5.2.4. Comparaison avec d'autres complexes d'espèces de *Fusarium*

Toutes les souches de FSSC étudiées partagent les mêmes mutations d'acides aminés connues pour être associées à une résistance aux azolés chez *A. fumigatus*. Les cinq principales mutations dans les séquences CYP51A décrites précédemment (H22, V170, L218, G253, D422) ont été comparées avec d'autres souches de FSSC de génotype différent ainsi qu'avec différents complexes d'espèces précédemment décrits dans la littérature (complexe d'espèces *Fusarium oxysporum* FOOSC, *Fusarium fujikuroi* FFSC et *Fusarium sambucinum* FSAMSC) (Tableau 15).

Les autres génotypes appartenant au FSSC présentent les mêmes acides aminés que notre panel. De manière intéressante, FSAMSC diffère de notre panel avec seulement 2 acides aminés communs parmi les cinq mutations ponctuelles. L'acide aminé en position 22, une Histidine (H) semble être spécifique au FSSC car seules les souches FSSC partagent cette mutation qui est substituée par une Asparagine (N) dans les autres complexes d'espèces. Concernant la position 218 située à l'entrée du canal, toutes les souches des différents complexes présentent le même acide aminé (Leucine (L)).

Tableau 15 : Comparaison des 5 mutations d'intérêt de CYP51A entre les souches étudiées et d'autres souches de différents complexes d'espèces

(FSSC, FOOSC, FFSC, FSAMSC) (D : acide aspartique ; E : acide glutamique ; G : glycine ; H : histidine ; I : isoleucine ; L : leucine ; N : asparagine ; V : valine)

Complexes	Position				
	22	170	218	253	422
<b>Complexe d'espèces <i>Fusarium solani</i> (FFSSC)</b>					
<u>Souches de l'étude</u>	<u>H</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>G</u>	<u>D</u>
<i>Fusarium falciforme</i>	H	V	L	G	D
<i>Fusarium floridanum</i>	H	V	L	G	D
<i>Fusarium keratoplasticum</i>	H	V	L	G	D
<i>Fusarium suttonianum</i>	H	V	L	G	D
<b>Complexe d'espèces <i>Fusarium oxysporum</i> (FOOSC)</b>					
<i>Fusarium odoratissimum</i> NRRL 54006	N	V	L	G	D
<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersicum</i> 4287	N	V	L	G	D
<b>Complexe d'espèces <i>Fusarium fujikuroi</i> (FFSC)</b>					
<i>Fusarium denticulatum</i>	N	V	L	G	E
<i>Fusarium fujikuroi</i> IMI 58289	N	V	L	G	E
<i>Fusarium proliferatum</i> ET1	N	V	L	G	E
<i>Fusarium verticillioides</i> 7600	N	V	L	G	E
<b>Complexe d'espèces <i>Fusarium sambucinum</i> (FSAMSC)</b>					
<i>Fusarium graminearum</i> PH-1	N	I	L	I	D
<i>Fusarium pseudograminearum</i> CS3096	N	I	L	I	D

### 5.3. Discussion

La variabilité de la sensibilité au voriconazole observée pour les souches FSSC dans notre étude soulève la question du mécanisme impliqué. Les alignements des séquences protéiques de CYP51A, CYP51B et CYP51C ont mis en évidence des similitudes entre les souches, mais ont également permis leur classification en différents profils : 9, 4 et 5 profils respectivement pour CYP51A, CYP51B et CYP51C. De plus, la classification en profils des séquences a permis de mettre en évidence un lien entre les CMI au voriconazole et la séquence de la protéine CYP51A. Cependant l'étude des différentes mutations retrouvées au sein du panel de FSSC étudié n'a pas permis de mettre en évidence des points de mutation au niveau du site actif de l'enzyme responsables des variations de CMI au voriconazole. En effet, la plupart des différences d'acides aminés entre les souches se situait en périphérie de la protéine ou à proximité du canal

d'entrée du substrat. Aucun motif de mutation n'a été mis en évidence pouvant être lié au profil de sensibilité au voriconazole. Des études sur l'impact de ces modifications d'acides aminés sur la conformation tridimensionnelle seraient intéressantes par la suite.

Jusqu'à présent, aucune mutation du gène de la 14 -déméthylase impliquée dans la résistance aux azolés n'avait été décrite au sein du complexe d'espèces *Fusarium solani*. En comparant les séquences protéiques de CYP51A des souches de FSSC testées avec celle d'*Aspergillus fumigatus*, nous avons montré que 5 des 23 mutations décrites dans la littérature comme étant associées à une modification de la sensibilité à l'azolé chez ce pathogène étaient retrouvées dans notre panel. La plupart de ces mutations ont été décrites comme responsables de la résistance au voriconazole chez *A. fumigatus* [204].

Chez ce champignon, une substitution de la méthionine 220 en lysine, isoleucine, valine ou thréonine a un impact sur la sensibilité au voriconazole. En effet, les souches cliniques avec la mutation M220I présentent des CMI au voriconazole augmentées [258]. Cette observation a également été prouvée en utilisant des levures génétiquement modifiées exprimant le mutant CYP51 M220I d'*A. fumigatus* [259]. L'isoleucine trouvée chez *A. fumigatus* est très proche structurellement de la leucine en position 218 dans le panel de FSSC étudié. Ces deux acides aminés appartiennent au groupe des acides aminés apolaires et partagent les mêmes propriétés physicochimiques. Il a été montré que les modifications des acides aminés, dues à leurs propriétés physico-chimiques (polarité, hydrophobicité...), sont responsables de modifications de la conformation de la protéine et par conséquent de son affinité avec des cibles telles que les azolés [260].

Fait intéressant, L218, correspondant à M220 pour *A. fumigatus*, est commun à toutes les souches. Par modélisation de la structure de CYP51A, avec *Fusarium vanettenii* mpVI 77-13-4 comme séquence requête, nous avons observé que L218 est situé à l'entrée du canal du substrat. Cette leucine conservée en position 218 et son rôle dans la conformation des canaux protéiques ont également été décrits par James *et al.* [249]. Ainsi, nous proposons que le résidu L218 soit directement impliqué dans la discrimination de l'azolé en modifiant la forme de l'entrée du canal du substrat pour le complexe d'espèces *Fusarium solani* voire le genre *Fusarium*.

Concernant l'influence de la mutation en position 22 sur la discrimination des azolés, une possibilité pourrait être son influence sur l'orientation de l'hélice A0 qui fait partie intégrante

de l'entrée du canal. Une deuxième possibilité pourrait être le blocage du CYP51A contre la membrane, ce qui pourrait influencer l'accessibilité de la longue chaîne azolée au site actif. Les mutations aux positions 170, 253 et 422 ont également conduit à une faible sensibilité à l'azolé dans notre étude, alors qu'elles sont situées loin du site de liaison de l'azolé. Bien que leur rôle précis dans la discrimination des azolés soit difficile à évaluer au niveau moléculaire, on peut émettre l'hypothèse que les acides aminés à ces positions pourraient être des résidus clés qui affectent la plasticité du CYP51A au sein du complexe d'espèces *Fusarium solani*, nécessaire pour la liaison du ligand.

La littérature rapporte que certaines souches d'*A. fumigatus* présentent une résistance ou une sensibilité réduite à un ou plusieurs azolés sans qu'aucune mutation ne soit détectée dans le gène *CYP51A*. Ces phénotypes ont été expliqués par la présence de mutations dans le gène *CYP51B* [261,262]. Ces mutations ponctuelles n'ont pas été retrouvées dans notre panel. La même observation a été faite pour CYP51C en comparaison avec *Aspergillus flavus*.

Peu d'études se sont concentrées sur les complexes d'espèces de *Fusarium* autre que le FSSC, et leur résistance aux azolés utilisés en clinique. En effet, le genre *Fusarium* est également un phytopathogène. Des études sur *Fusarium graminearum* (FSAMSC) et le complexe FOOSC ont montré que le gène *CYP51A* code une 14-déméthylase inductible, déterminant la sensibilité aux azolés. Au contraire, CYP51B est une 14-déméthylase impliquée dans la formation des ascospores, mais peu impactée par les antifongiques. En effet, une augmentation de la sensibilité aux antifongiques azolés a été décrite dans des souches délétées pour le gène *CYP51A* ( $\Delta$ CYP51A), mais aucune différence n'a été observée pour les mutants  $\Delta$ CYP51B.

La protéine CYP51C est spécifique au genre et se trouve dans le genre *Fusarium*. Cependant, son rôle n'est pas clairement établi. Des études montrent que CYP51C n'est pas impliqué dans la 14-déméthylation du stérol, cependant la délétion du gène augmente la sensibilité à certains inhibiteurs de la déméthylase [206,207].

Récemment, de nouveaux paralogues de CYP51 ont été décrits. Semblable à CYP51B, un nouveau paralogue nommé CYP51D est impliqué dans la résistance aux azolés et se retrouve dans le génome de champignons appartenant aux Eurotiomycètes. Un nouveau gène partiel de *CYP51A* code une forme tronquée de la protéine CYP51A responsable de la résistance aux azolés [263].

Pour notre étude, nous nous sommes concentrés sur CYP51A, la protéine la plus impliquée dans la résistance aux azolés chez le genre *Fusarium* [206,264–267]. Pour mieux caractériser nos résultats obtenus sur les modifications d'acides aminés, nous avons comparé la séquence de la protéine CYP51A de nos souches FSSC avec d'autres souches du même complexe et avec des souches d'autres complexes. Toutes les souches des différents complexes présentaient en position 218 le même acide aminé (L218) que celui de notre panel. Notre hypothèse est que cette observation pourrait être un premier indice pour expliquer la faible sensibilité des antifongiques azolés utilisés en clinique dans le genre *Fusarium*. D'autres études devraient être réalisées pour confirmer et généraliser nos découvertes sur les champignons fusarioïdes.

## 6. EFFLUX ET RESISTANCE

### 6.1. Matériels et méthodes

#### 6.1.1. Evaluation de l'impact de l'efflux sur la résistance par cytométrie en flux

L'évaluation de l'activité des pompes d'efflux a été étudiée sur 5 souches de FSSC (FSSC20, FSSC29, FSSC47, FSSC86 et FSSC118) en présence d'un inhibiteur, la prométhazine (PMZ). L'analyse a été réalisée par cytométrie en flux grâce à la rhodamine 6G (R6G), selon Li *et al.* et Cordeiro *et al.* [218,219], avec des adaptations. La rhodamine 6G (R6G) est un colorant fluorescent utilisé pour déterminer l'activité de transport des pompes d'efflux membranaires. En effet, cette molécule est prise en charge par des transporteurs de type ABC donc dépendants de l'énergie fournie par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP.

Après culture sur milieu de Sabouraud gélosé, pendant 72 heures à 30°C, une suspension de conidies a été préparée dans une solution de NaCl à 0,9 %. Le culot de conidies, obtenu après centrifugation, a été lavé avec du PBS à 4°C et remis en suspension dans celui-ci. La suspension a été ensuite ajustée à 10<sup>7</sup> conidies/mL et distribuée dans les différents tubes. Une solution de R6G a été ajoutée à la suspension afin d'obtenir une concentration en R6G à 15 µM. Les cellules ont été incubées à 37°C pendant 1 heure sous agitation pour favoriser l'accumulation intracellulaire du composé fluorescent.

Pour évaluer l'effet de l'inhibiteur PMZ, les conidies ont été exposées 5 minutes avant l'ajout de R6G (15µM) à une concentration de PMZ allant de 4 à 32 µg/mL. Une fois centrifugées, lavées au PBS à 4°C, les cellules ont été remises en suspension dans du PBS additionné de 2 % de glucose. Des échantillons de 1 mL ont été prélevés, pour chaque tube, à 0 et 30 min puis centrifugés. Le culot de conidies a été lavé, remis en suspension dans du PBS sans glucose et analysé par cytométrie en flux à 533 nm. Un contrôle sans glucose, ainsi qu'un tube témoin sans R6G afin d'évaluer l'autofluorescence des conidies (témoin blanc) ont été réalisés pour chaque expérience.

### 6.1.2. Mise en culture avec exposition au voriconazole

Le niveau d'expression d'*ABC1*, gène codant une protéine d'efflux, a été évalué sur plusieurs souches en présence d'une concentration sub-inhibitrice de voriconazole. Les différentes souches ont été cultivées dans 25 mL de milieu de Sabouraud dextrose bouillon (SBD) en présence ou non de voriconazole à différentes concentrations, CMI  $\frac{1}{2}$  et CMI  $\frac{1}{4}$  (Tableau 16). L'expression génique a été évaluée à différents temps d'exposition : (i) 20 minutes ; (ii) 1 heure ; (iii) 4 heures.

Tableau 16 : Souches de FSSC étudiées dans l'expression génique d'*ABC1* en présence de voriconazole à différentes concentrations (n : réplicat biologique)

Souches	CMI <sub>VRZ</sub> (µg/mL)	Concentration d'exposition	
		CMI $\frac{1}{2}$ (µg/mL)	CMI $\frac{1}{4}$ (µg/mL)
FSSC20 (n=2)	2	1	0,5
FSSC102 (n=2)	2	1	0,5
FSSC45 (n=1)	4	2	1
FSSC98 (n=3)	4	2	1
FSSC118 (n=3)	8	4	2
FSSC47 (n=2)	16	8	4

### 6.1.3. Expression génique en présence d'antifongique

#### 6.1.3.1. *Choix du gène de référence*

Afin de quantifier l'expression d'un gène cible, il est nécessaire de rapporter les résultats à un gène de référence dont l'expression reste stable indépendamment des conditions de culture. Plusieurs gènes de référence décrits dans la littérature [137,138,249,268–270] (Tableau 17) ont été évalués dans plusieurs conditions (Tableau 18).

Quatre souches de FSSC ont été sélectionnées, FSSC21, FSSC111, FSSC 118 et FSSC121. Les cultures ont été centrifugées et rincées pour éliminer toute trace de milieu de culture. Les culots pour l'extraction d'ARN ont subi un prétraitement de broyage par un homogénéiseur de paille à vitesse élevée (MP Biomedicals™ FastPrep-24™ 5G, Fisher Scientific SAS, France) selon le protocole du fournisseur. L'extraction sur homogénat de l'ARN a été réalisée grâce au kit Monarch® Total RNA Miniprep (New England Biolabs® Inc., Ipswich, MA, Etats-Unis).

Les RT-qPCR ont été réalisées à l'aide du kit SYBR® Green (BioRad, France) dans des volumes de réaction de 20 µL contenant 1 µL d'ADN complémentaire (ADNc) obtenu après élimination d'ADN génomique résiduel (ADNg) et rétro transcription de l'ARN total (1µL) (kit QIAGEN OneStep RT-PCR, QIAGEN, Etats-Unis). Les expériences ont été réalisées dans un thermocycleur CFX96 (Biorad, France). Les cycles seuil (Cycle Threshold (Ct)) ont ensuite été comparés entre eux pour évaluer la stabilité de l'expression génique en fonction des différentes conditions de culture, en utilisant l'algorithme NormFinder publié par Andersen *et al.* [271]. Une approche par comparaison des coefficients de variation a également été réalisée *via* le logiciel Excel (Microsoft, Etats-Unis) et les graphiques par le logiciel GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

Tableau 17 : Gènes de référence et leurs amorces utilisées pour cette étude

Locus	Gène de référence	Amorces	Séquence (5'-3')	Référence
<i>ACC</i>	Acétylcoenzyme A carboxylase	FsACC-F FsACC-R	CTCGTGAGATCATGATCCAGT GTTGATAACAGCGGAGAGCT	Debourgogne <i>et al.</i> 2010
<i>EF1-α</i>	Elongation factor 1-α	EF-F EF-R	AGGTATTAAGCAGTACTTTTCTC GGACTAGACTCAAATTAGTATTTG	O'Donnell <i>et al.</i> 2008
<i>GADP</i>	Glycéraldéhyde 3P déshydrogénase	FsGPD-F FsGPD-R	CATGAGAGCTCTAGCTCCTGTTTAG CTTGAGCGATCTACGCTTACTTGGA	Debourgogne <i>et al.</i> 2010
<i>ITS</i>	nuLSU Nuclear ribosomal rRNA	ITS1 ITS4	TCCGTAGGTGAACCTGCGG TCTCCGCTTATGATATGC	White <i>et al.</i> 1990
<i>MDP</i>	Mannitol 1P déshydrogénase	FsMDP-F FsMDP-R	CGTCGAGAACACCATCACAAA ATGGGGTTGCCAATTCGCT	Debourgogne <i>et al.</i> 2010
<i>SOD</i>	Superoxyde dismutase	FsSOD-F FsSOD-R	TGGGACATCACCGGTAACGA CAGTCTGAGAGACTCCTCG	Debourgogne <i>et al.</i> 2010

Tableau 18 : Conditions de culture évaluées pour détermination du gène de référence le plus stable (RPMI : milieu RPMI, SBD : Sabouraud, TA : température ambiante)

Milieu	Type	Température	Conditions
Liquide	SBD	30°C	-
Liquide	SBD	30°C	Microgravité
Liquide	SBD	30°C	Présence de voriconazole à ½ CMI
Liquide	SBD	30°C	Présence d'amphotéricine B à ½ CMI
Liquide	SBD	30°C	Présence de calcofluor à 10 %
Solide	SBD	30°C	-
Solide	RPMI	30°C	-
Solide	Malt	30°C	-
Solide	SBD	TA	-
Solide	SBD	37°C	-

### 6.1.3.2. Expression génique d'*ABC1*

Pour chaque souche testée, une culture en présence de voriconazole à ½ CMI et ¼ CMI a été réalisée en parallèle d'une culture témoin sans antifongique. L'ARN total a été extrait à différents temps d'exposition au voriconazole, soit 20 minutes, 1 heure et 4 heures. Les cultures ont été centrifugées et rincées pour éliminer toute trace de milieu de culture. L'ARN total a été extrait selon les modalités décrites précédemment (§ 6.1.3.1 Choix du gène de référence).

Les RT-qPCR ont été réalisées à l'aide du kit SYBR® Green (BioRad, France) dans des volumes de réaction de 20 µL contenant 1 µL d'ADN complémentaire (ADNc) obtenu après élimination d'ADN génomique résiduel (ADNg) et rétro transcription de l'ARN total (kit QIAGEN OneStep RT-PCR, QIAGEN, Etats-Unis). Après amplification et quantification en temps réel, la spécificité des amplicons a été vérifiée par courbe de fusion (65°C à 95°C, mesure de la fluorescence/0,5°C). Les expériences ont été réalisées dans un thermocycleur CFX96 (Biorad, France). Les amorces pour évaluer l'expression du gène *ABC1* ont été construites *via* le logiciel Geneious Prime®. Elles se situent au niveau d'un exon pour pouvoir être utilisées sur les deux types de matrices (ADN et ARN) (Tableau 19).

Tableau 19 : Amorces utilisés pour quantifier l'expression du gène *ABC1* (*MDP* : gène de référence)

Amorces	Séquence (5'-3')
ABC1exp-F	CGACAACGCCAACATTCAGG
ABC1exp-R	CAGTCAGAGTACCGGGCTTG
FsMDP-F	CGTCGAGAACACCATCACAAA
FsMDP-R	ATGGGGGTTGCCAATTCGCT

La méthode Livak a été choisie pour normaliser les rapports d'expression des souches cultivées en présence d'antifongiques par rapport aux cultures de contrôle. Les transcrits cibles et de référence ont été amplifiés avec des efficacités proches de 100 % et dont les valeurs ne différaient pas l'une de l'autre de plus de 5 % [272]. Les variations d'expression ont été exprimées en « fold change » ou en puissance de 2 :  $2^x$ , avec x positif signifiant une surexpression. Le « fold change » correspond au changement d'une quantité (ici expression de gène) entre 2 conditions, culture témoin versus culture en présence de voriconazole. Les représentations graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

## 6.2. Résultats

### 6.2.1. Evaluation de l'impact de l'efflux sur la résistance par cytométrie en flux

Au temps  $T_0$ , deux populations distinctes ont été mises en évidence par cytométrie en flux, l'une présentant une fluorescence et l'autre pas. Toutes les conidies n'avaient pas internalisé le composé fluorescent R6G.

L'efflux de rhodamine 6G après ajout de glucose dans la suspension fongique a été observé. Le pourcentage de la population présentant une fluorescence à  $T_0$  a diminué drastiquement 30 minutes après l'injection à  $T_{30}$  (36 à 7 % pour la souche FSSC47 par exemple) (Figure 34C et D). Par ailleurs, les conditions de mesure en l'absence de glucose ne montrent pas de différences

de répartition de populations entre T<sub>0</sub> et T<sub>30</sub> (Figure 34A et B). Ces données préliminaires confirment la présence de transporteurs de type ABC chez les souches de *Fusarium* utilisées pour cette approche.

Cependant, la présence d'inhibiteurs de pompes d'efflux type ABC n'a eu aucun impact sur l'efflux de la R6G. Le panel de souches testées comprenait des souches présentant des CMI au voriconazole variées allant de 2 à 16 µg/mL. Malgré plusieurs tentatives, les résultats n'ont pas pu mettre en évidence une corrélation entre efflux et CMI, en l'absence d'effet inhibiteur tout au long du processus d'évaluation.

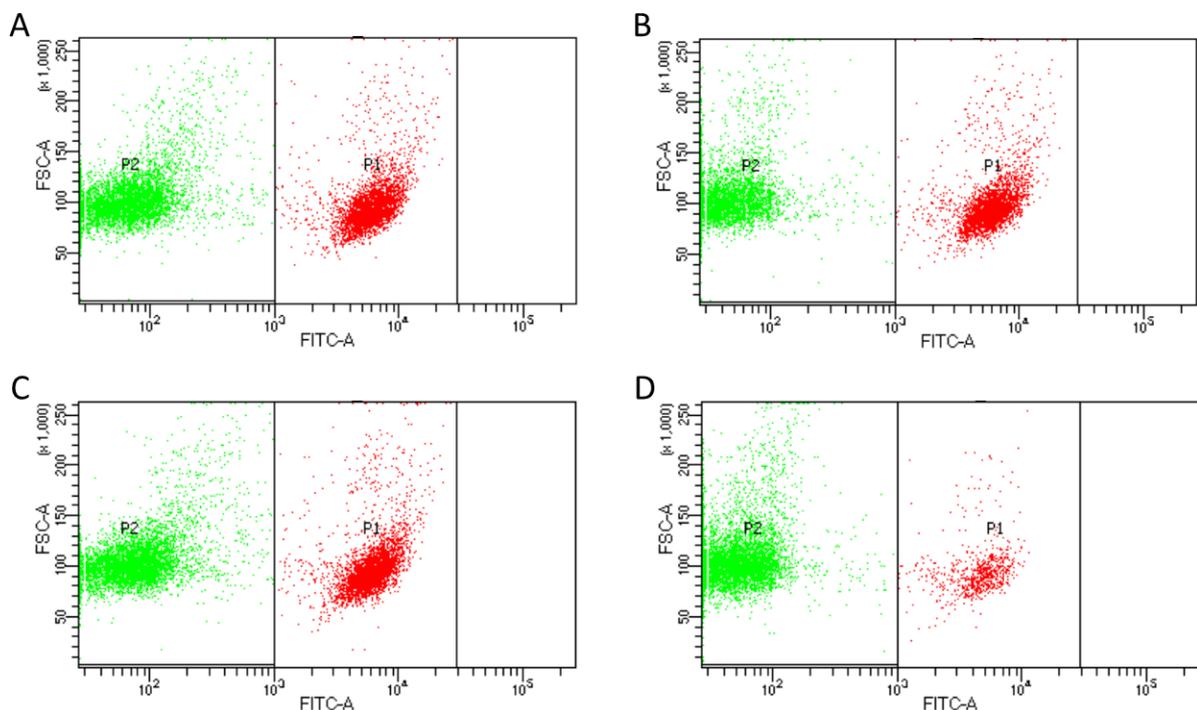


Figure 34 : Répartition des différentes populations de conidies de la souche FSSC47 par cytométrie en flux en absence (A, B) ou présence (C, D) de glucose à T<sub>0</sub> (A,C) et T<sub>30</sub> (B, D) (P1 : population ayant internalisée la R6G, P2 : population sans fluorescence, FITC : canal de mesure de fluorescence, FSC : canal de mesure selon la taille des cellules)

## 6.2.2. Expression génique en présence d'antifongique

### 6.2.2.1. *Gène de référence*

Les données obtenues après RT-qPCR pour les différents gènes de référence évalués ont été intégrées dans l'algorithme NormFinder. Selon l'algorithme, plus la valeur de stabilité (stability

value) est faible, plus le gène de référence est stable. Les résultats montrent le locus *MDP* (Mannitol 1P déshydrogénase) comme étant le gène le plus stable avec un score de 0,870 (Tableau 20). La combinaison des deux loci, *MDP* et *EF* (Elongation factor 1- $\alpha$ ), présente la meilleure stabilité pour l'utilisation de deux gènes de référence pour quantifier l'expression génique.

L'approche par analyse de la dispersion des valeurs de Ct a montré des résultats similaires (Figure 35). Les trois loci présentant un coefficient de variation (CV) le plus faible sont *ACC*, *GAPD* et *MDP* avec respectivement des CV de 10,5 %, 11,5 % et 11,7 % (Tableau 21). Le loci *ITS* semble être le moins stable avec un CV de 22 %, concordant avec l'indice de stabilité élevé (2,524) retrouvé par l'algorithme NormFinder. Ainsi, pour la suite de nos analyses d'expression génique, le gène de référence utilisé sera *MDP*.

Tableau 20 : Gènes de référence évalués et leurs valeurs de stabilité obtenues par l'algorithme NormFinder

(plus la valeur est faible, plus le gène est considéré comme stable)

Locus	Gène de référence	Valeur de stabilité
ACC	Acétylcoenzyme A carboxylase	0,986
EF1- $\alpha$	Elongation factor 1- $\alpha$	0,953
GADP	Glycéraldéhyde 3P déshydrogénase	0,997
ITS	nuLSU Nuclear ribosomal rRNA	2,524
MDP	Mannitol 1P déshydrogénase	0,870
SOD	Superoxyde dismutase	1,074

Tableau 21 : Gènes de référence évalués par comparaison des coefficients de variation (CV)

Locus	Gène de référence	Moyenne (Ct)	Intervalle (Ct)	CV (%)
ACC	Acétylcoenzyme A carboxylase	28,40	22,71-35,09	10,5 %
EF1- $\alpha$	Elongation factor 1- $\alpha$	21,23	15,95-26,74	14,6 %
GADP	Glycéraldéhyde 3P déshydrogénase	21,44	15,69-26,74	11,5 %
ITS	nuLSU Nuclear ribosomal rRNA	24,94	16,91-38,05	22,0 %
MDP	Mannitol 1P déshydrogénase	25,62	20,74-33,90	11,7 %
SOD	Superoxyde dismutase	26,88	20,90-34,89	12,2 %

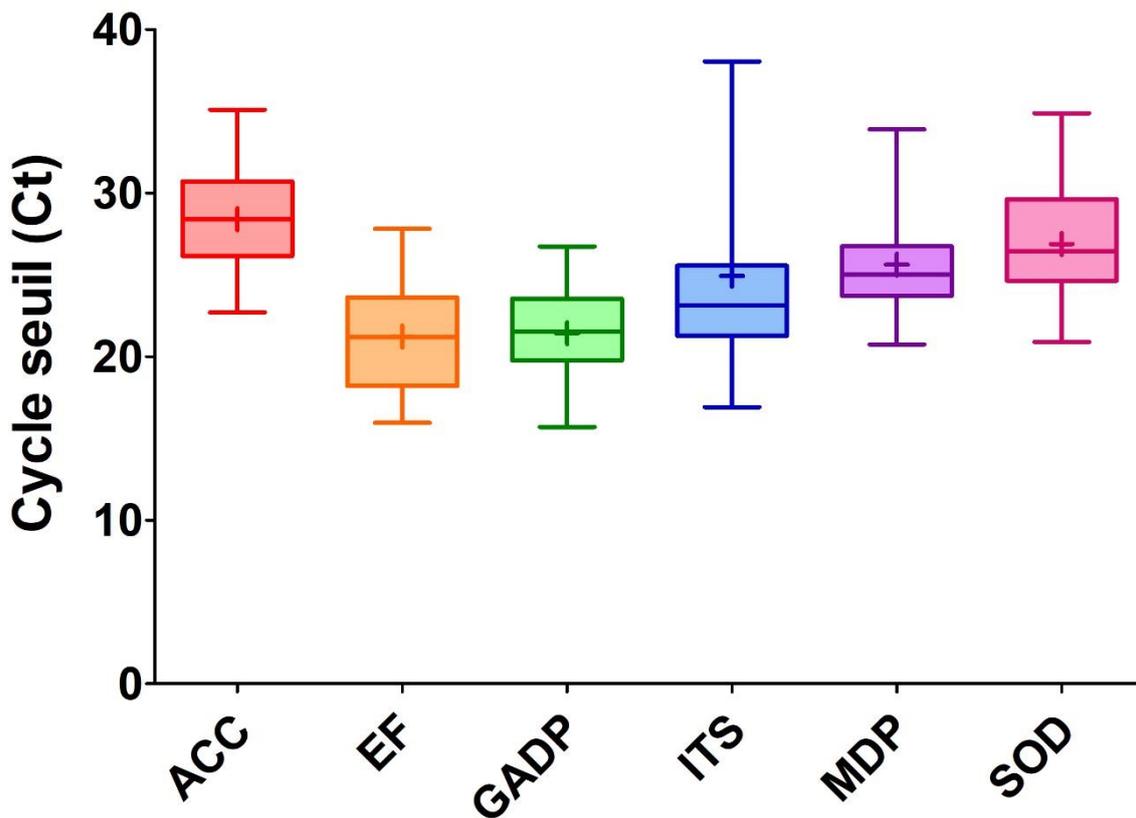


Figure 35 : Variabilité des valeurs de cycle seuil (Ct pour cycle threshold) de chaque gène en fonction des conditions de culture

(boîte : valeurs comprises entre les 1<sup>er</sup> et 3<sup>ème</sup> quartiles de la distribution, trait : médiane, croix : moyenne, moustaches : valeurs minimales et maximales)

#### 6.2.2.2. Expression génique d'*ABC1*

Concernant les cultures exposées à des concentrations en voriconazole équivalentes à ½ CMI, l'expression du gène *ABC1* semble liée à la souche (Figure 36). En effet, les souches FSSC20, 102, 45, 98 présentent un niveau d'expression proche de 1, soit une absence de variation de l'expression. Ces 4 souches sans modification de l'expression présentent des CMI à 2 ou 4 µg/mL. La souche FSSC118 surexprime *ABC1*, avec un maximum de 6 fois après 20 minutes d'exposition. Cette dernière présente une CMI à 8 µg/mL. À l'inverse, la souche FSSC47, présentant une CMI élevée (16 µg/mL), exprime 50 à 120 fois plus *ABC1* en présence de voriconazole que la culture témoin.

Ces observations permettent de mettre en évidence un lien entre niveau d'expression d'*ABC1* et la CMI de la souche. En effet, la présence de voriconazole n'induit pas ou peu l'expression

d'*ABC1* chez les souches présentant une CMI faible au voriconazole. Seule la souche avec une CMI élevée surexprime le gène *ABC1* en présence de l'antifongique. Par ailleurs, il n'a pas été mis en évidence de différence de niveau d'expression entre les différents temps d'exposition, le nombre de valeurs ne permettant pas de réaliser de test statistique.

Les cultures en présence de voriconazole à CMI  $\frac{1}{4}$  montrent les mêmes résultats que ceux observés pour CMI  $\frac{1}{2}$  (Figure 37). L'expression d'*ABC1* est plus importante pour la souche présentant une valeur de CMI élevée au voriconazole (FSSC47). Cette fois, l'expression des autres souches avoisine la valeur 1, correspondant à une expression basale comme la culture témoin. Contrairement à la culture à CMI  $\frac{1}{2}$ , il semble que l'expression varie légèrement en fonction du temps d'exposition pour la souche FSSC47, avec une surexpression maximale après 1 heure d'exposition au voriconazole à CMI  $\frac{1}{4}$ , soit 113 fois l'expression basale.

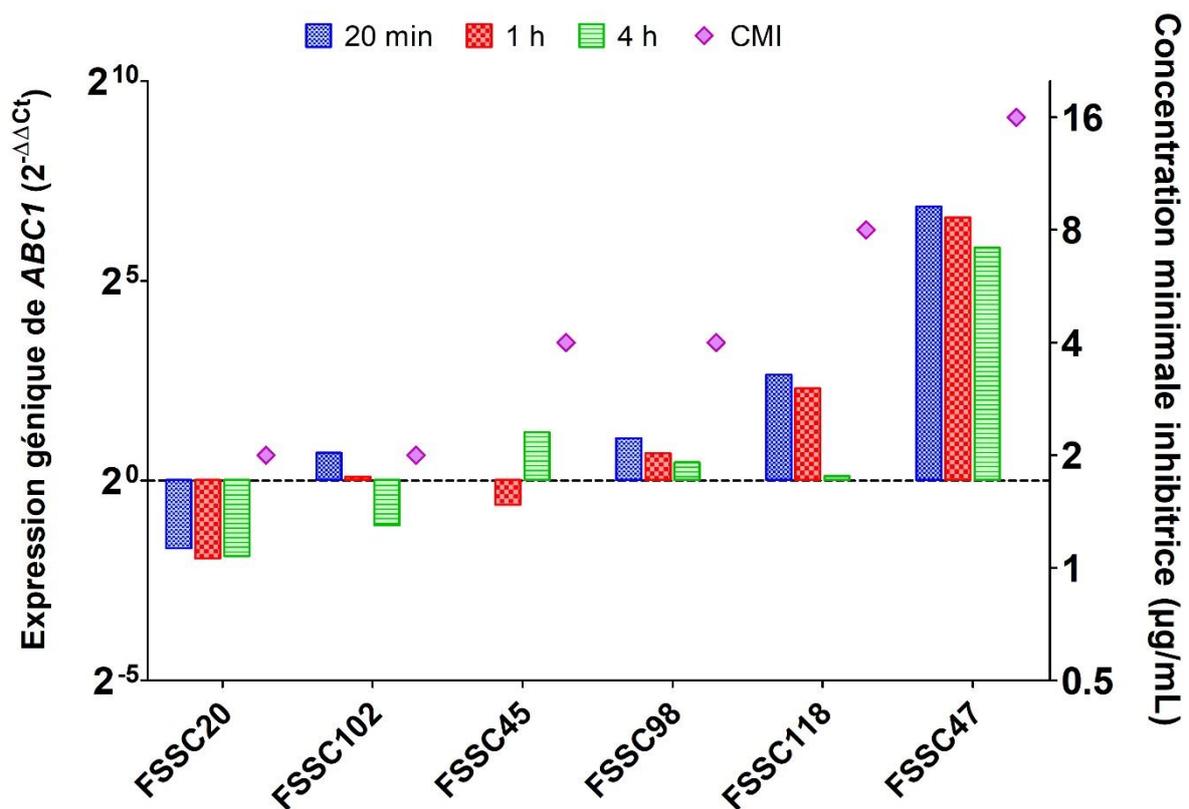


Figure 36 : Expression du gène *ABC1* normalisée par le gène *MDP*, à différents temps d'exposition au voriconazole à concentration CMI  $\frac{1}{2}$  des FSSC20 (n=2), FSSC102 (n=2), FSSC45 (n=1), FSSC98 (n=3), FSSC118 (n=3), FSSC47 (n=2) et leurs CMI respectives

(bleu : exposition de 20 min, rouge : exposition d'1 h, vert : exposition de 4 h, losange violet : CMI)

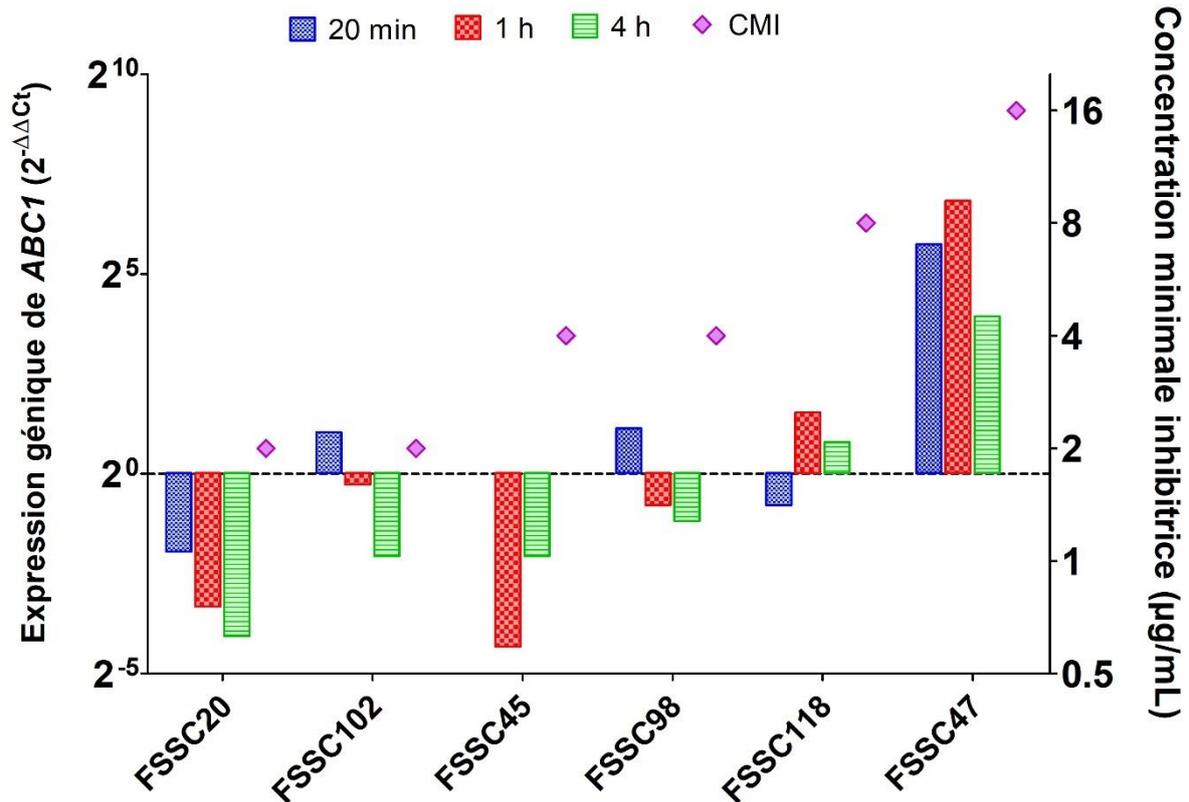


Figure 37 : Expression du gène *ABC1* normalisée par le gène *MDP*, à différents temps d'exposition au voriconazole à concentration CMI ¼ des souches FSSC20 (n=2), FSSC102 (n=2), FSSC45 (n=1), FSSC98 (n=3), FSSC118 (n=3), FSSC47 (n=2) et leurs CMI respectives

(bleu : exposition de 20 min, rouge : exposition d'1 h, vert : exposition de 4 h, losange violet : CMI)

### 6.3. Discussion

Les antifongiques azolés de deuxième génération, comme le voriconazole, présentent un intérêt thérapeutique contre un grand nombre de micromycètes. Cependant, certains champignons présentent une sensibilité réduite aux azolés, comme *Candida glabrata* et *Candida krusei*. Cette résistance a également été décrite comme inductible chez *Candida albicans* [273]. L'efflux dépendant de l'énergie est connu pour être un des mécanismes de la résistance aux azolés. Celui-ci est catalysé par des pompes d'efflux membranaires qui appartiennent généralement à la sous-famille des transporteurs ABC (ATP-Binding Cassette). Il existe une deuxième classe de pompes d'efflux responsables de la résistance aux antifongiques. Il s'agit des pompes de la

superfamille des facilitateurs majeurs (MFS), utilisant le gradient électrochimique transmembranaire comme source d'énergie pour transporter leurs substrats [212].

De nombreuses publications se sont intéressées à la résistance par mécanisme d'efflux chez le genre *Candida*. Il a été montré que la surexpression des pompes d'efflux ABC était souvent liée à une résistance aux azolés. Chez *Candida*, deux gènes ont été mis en évidence, *CDR1* et *CDR2*. Le gène *CDR1* semble être l'acteur majeur des mécanismes d'efflux, la surexpression de ce dernier ayant une conséquence significative sur la résistance aux azolés. Il existe également des gènes codant des transporteurs MFS mais leur implication dans la résistance est plus minime que les transporteurs ABC [274,275].

Par la suite la recherche de résistance par mécanisme d'efflux a également été réalisée sur des champignons filamenteux comme ceux du genre *Aspergillus*. Chez *Aspergillus flavus*, plus de la moitié des souches résistantes aux azolés ne montre aucune mutation au niveau du gène *CYP51*, suggérant que la résistance est due à un autre mécanisme, comme l'efflux. Plusieurs études ont montré que les gènes codant des pompes d'efflux de type ABC pouvaient être surexprimés 5 à 30 fois par rapport à l'expression basale chez des souches d'*Aspergillus* résistantes aux azolés. L'inactivation de ces gènes chez un isolat résistant entraînait une diminution d'un facteur 4 des CMI à différents azolés dont le voriconazole [276,277].

Il a également été démontré qu'une culture en présence d'azolés à concentration sub-inhibitrice induisait une augmentation du niveau d'expression de gènes codant des transporteurs ABC. Les résultats de l'équipe de Natesan suggèrent l'existence d'une corrélation entre le niveau de surexpression et les valeurs de CMI aux azolés chez les souches d'*Aspergillus flavus* résistantes aux azolés, malgré la diversité des niveaux d'expression au sein des différents isolats. Suite à l'induction par le voriconazole à concentration sub-inhibitrice, il est apparu que les souches avec une forte surexpression ( $\geq 50$  fois) présentaient des CMI au voriconazole les plus élevées, avec des valeurs comprises entre 8 et 64  $\mu\text{g/mL}$ . A l'inverse, les souches avec des valeurs de CMI plus basses, entre 2 et 4  $\mu\text{g/mL}$ , avaient vu l'expression de gènes multipliée par 20 ou moins. Malgré l'absence de corrélation *in vitro-in vivo* clairement établie, l'induction de l'expression soulève une question clinique importante. En effet, l'apparition d'une résistance par induction serait préoccupante chez les patients recevant un traitement azolé à long terme. Selon les auteurs, une surexpression supérieure ou égale à 10 fois la normale pourrait être considérée comme significative et liée à la résistance aux azolés [278].

Une autre étude montre des résultats d'expression basale en opposition avec d'autres données de la littérature. Il n'a pas été observé de différence d'expression basale des gènes de pompes d'efflux entre les différents isolats et ce quelle que soit la sensibilité aux azolés. Selon les auteurs, ces premiers résultats suggèrent qu'en l'absence de stress induit par un antifongique, les pompes d'efflux jouent un rôle limité dans la résistance. A l'inverse, en réponse à une exposition, une surexpression hétérogène a été observée au sein des isolats de l'étude, de type sauvage ou non [279].

A l'heure actuelle, seules quelques études se sont intéressées aux pompes d'efflux et leur impact sur la résistance mais également sur la virulence du champignon chez *Fusarium*. Une étude a montré, chez *Fusarium graminearum*, que le transporteur ABC-C codé par le gène *FgABCC9* était essentiel pour la croissance mycélienne et la pathogénicité vis-à-vis du blé. La délétion de ce gène entraîne une pathogénicité moindre ainsi qu'une sensibilité accrue au tébuconazole. Ces mêmes constats ont pu être mis en évidence chez le complexe d'espèces *Fusarium solani* (FSSC). Le gène *ABC1* a été présenté également comme un facteur de virulence important par Coleman *et al.* [280]. Récemment, l'équipe de James a mis en évidence un orthologue du gène *ABC1* chez *Fusarium keratoplasticum*, ce champignon faisant partie du complexe FSSC [220]. L'expression de celui-ci est inductible en présence de voriconazole. Contrairement à nos résultats, l'expression augmente dans ce travail en fonction du temps d'exposition chez une souche résistante au voriconazole. La caractérisation de l'activité de la pompe d'efflux ABC1 a montré qu'elle était impliquée dans le transport de composés de grande taille, comme le voriconazole. La CMI de cet antifongique pour une souche de *Saccharomyces cerevisiae* ADΔΔ surexprimant le gène *ABC1* a été multipliée par 16.

Il semble que le transporteur ABC1 joue un rôle dans la résistance aux azolés chez FSSC. Les résultats de ce travail vont également dans ce sens, avec un potentiel lien entre CMI et expression du gène *ABC1*.

## **7. EVOLUTION EXPERIMENTALE ET EXPRESSION GENIQUE**

### **7.1. Matériels et méthodes**

#### **7.1.1. Evolution expérimentale de la résistance au voriconazole**

Afin de déterminer si la présence d'une concentration sub-inhibitrice d'antifongique dans le milieu induit une variation de la sensibilité de FSSC aux antifongiques, des cultures ont été ensemencées sur plusieurs générations en présence de voriconazole selon un protocole adapté de la littérature [267,281,282].

Cette approche a été réalisée sur les souches FSSC20 et FSSC102 sur 14 générations. Les souches ont été cultivées dans 40 mL de milieu de Sabouraud dextrose bouillon (SBD) en présence ou non de voriconazole à demi-concentration de la CMI initiale de la souche, soit 1 µg/mL pour les deux souches. Après 3 jours d'incubation à 37°C sous agitation, une partie de la culture a été remise en suspension dans du milieu frais contenant la même concentration d'antifongique et à nouveau incubée à 37°C pendant 3 jours sous agitation, formant ainsi la deuxième génération (Figure 38).

Une extraction d'ADN et d'ARN a été réalisée à chaque génération. Les cultures ont été centrifugées et rincées pour éliminer toute trace de milieu de culture. L'ADN a été extrait sur le culot de culture grâce au kit Monarch Genomic DNA Purification (New England Biolabs® Inc., Ipswich, MA, Etats-Unis). Les culots utilisés pour l'extraction d'ARN ont subi un prétraitement par un système de broyage et de lyse par agitation de microbilles à vitesse élevée (MP Biomedicals™ FastPrep-24™ 5G, Fisher Scientific SAS, France) selon le protocole du fournisseur. L'extraction de l'ARN à partir de l'homogénat a été réalisée grâce au kit Monarch® Total RNA Miniprep (New England Biolabs® Inc., Ipswich, MA, Etats-Unis).

Une détermination de la CMI du voriconazole en microdilution a également été réalisée sur les générations G1, G2, G3, G4 et G9 après sonication de la suspension (Vibra-cell, Sonics and Materials, Inc., Newtown, États-Unis).

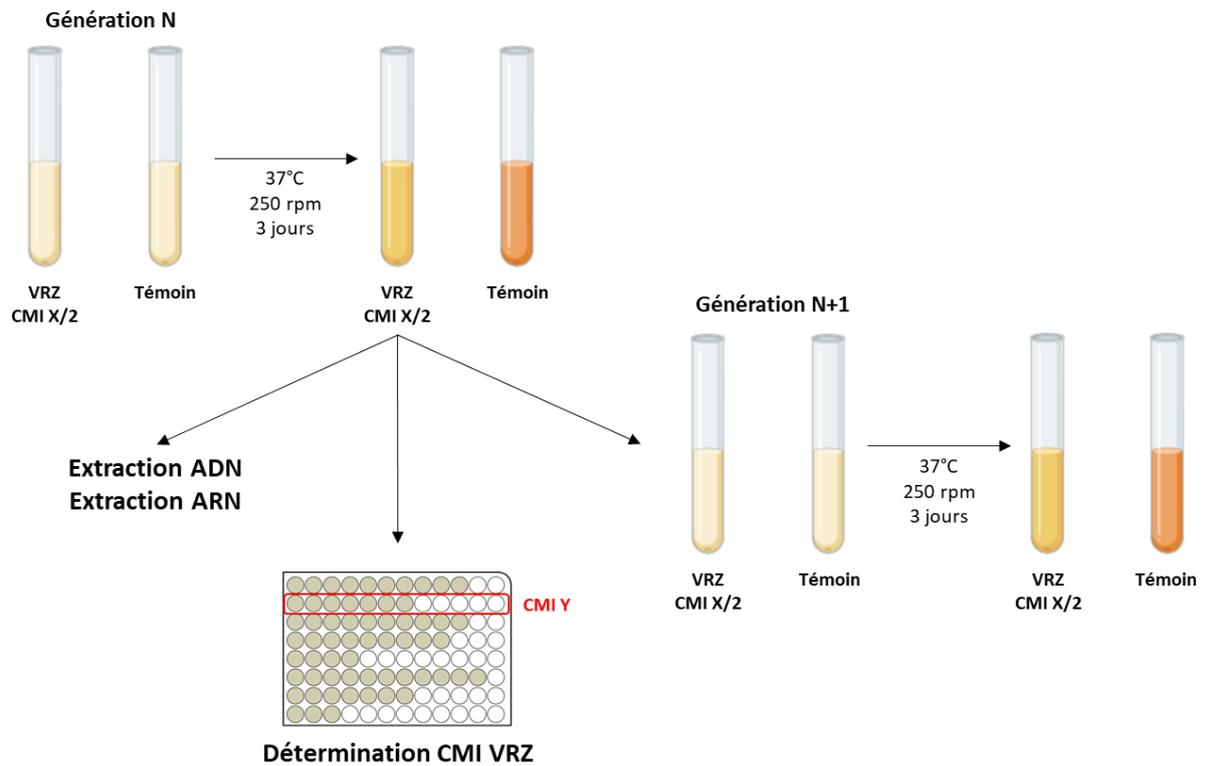


Figure 38 : Évolution expérimentale de FSSC en présence de concentration sub-inhibitrice de voriconazole

### 7.1.2. Évaluation de la mutagenèse de *CYP51A*

Afin d'évaluer l'apparition de nouvelles mutations au niveau du gène *CYP51A*, ce dernier a été amplifié grâce au kit Taq'Ozyme Purple Mix 2 (Ozyme, Saint-Cyr-l'École, France) en utilisant des amorces précédemment décrites (§ 5.1.1 Amplification et séquençage des gènes *CYP51A*, *B* et *C* (Tableau 7)). Le séquençage selon la méthode Sanger a été réalisé par la société Eurofins Genomics.

Les analyses de séquences et leurs alignements ont été réalisés grâce au logiciel Geneious Prime® (Geneious v2021.1). Les résultats ont été comparés à ceux précédemment obtenus avec les souches d'origine, non exposées. Les séquences des ARNm sont issues des alignements des séquences nucléotidiques avec celles des ARNm de *CYP51A* de *Fusarium vanettenii* mpVI 77-13-4. Une fois l'épissage réalisé, les séquences ARNm des souches sont traduites en séquences protéiques. Les séquences protéiques des souches d'origine et des souches exposées au

voriconazole pendant 14 générations ont été alors alignées et comparées, *via* le logiciel Geneious Prime®.

### 7.1.3. Evaluation des variations d'expression de *CYP51A* et *ABC1*

Pour quantifier l'expression de *CYP51A* et d'*ABC1*, une RT-PCR quantitative (RT-qPCR) a été réalisée et les résultats normalisés par l'expression du gène de référence, *MDP*. Les volumes d'ARN total testés étaient de 1 µL. Les RT-qPCR ont été réalisées à l'aide du kit SYBR® Green (BioRad, France) dans des volumes de réaction de 20 µL contenant 1 µL d'ADN complémentaire (ADNc) obtenu après élimination d'ADN génomique résiduel (ADNg) et rétro transcription de l'ARN total (kit QIAGEN OneStep RT-PCR, QIAGEN, Etats-Unis). Après amplification et quantification en temps réel, la spécificité des amplicons a été vérifiée avec l'analyse des courbes de fusion (65°C à 95°C, mesure de la fluorescence/0,5°C). Les expériences ont été réalisées dans un thermocycleur CFX96 (Biorad, France).

Les amorces pour évaluer l'expression du gène *CYP51A* ont été construites *via* le logiciel Geneious Prime®. Elles se situent au niveau d'un exon pour pouvoir être utilisées sur les deux matrices extraites (ADN et ARN). Les différentes amorces et leurs séquences (5'-3') sont présentées dans le Tableau 22.

Tableau 22 : Amorces utilisés pour quantifier l'expression du gène *CYP51A* et *ABC1* (*MDP* : gène de référence)

Cible	Amorces	Séquence (5'-3')
CYP51A	CYP51Aexp-F	CGGCTAGCTCCTGGATCATG
	CYP51Aexp-R	GAGGTGGAAGATAGCCGTCG
ABC1	ABC1exp-F	CGACAACGCCAACATTCAGG
	ABC1exp-R	CAGTCAGAGTACCGGGCTTG
MDP	FsMDP-F	CGTCGAGAACACCATCACAAA
	FsMDP-R	ATGGGGGTTGCCAATTCGCT

La méthode Livak a été choisie pour normaliser les rapports d'expression des souches cultivées en présence d'antifongiques par rapport aux cultures de contrôle. Les transcrits cibles et de référence ont été amplifiés avec des efficacités proches de 100 % et dont les valeurs ne

différait pas l'une de l'autre de plus de 5 % [272]. Les variations d'expression ont été exprimées en « fold change » ou en puissance de 2 :  $2^x$ , avec x positif signifiant une surexpression. Le « fold change » correspond au changement d'une quantité (ici expression de gène) entre 2 conditions, culture témoin versus culture en présence de voriconazole. Les représentations graphiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 5.01 (GraphPad Software, San Diego, California USA).

## 7.2. Résultats

### 7.2.1. Evolution expérimentale de la résistance au voriconazole

Les souches sélectionnées ne montrent aucune variation de CMI pendant toute la durée de l'expérience (aux générations G1, G2, G3, G4 et G9). La valeur de la CMI au voriconazole est restée identique à celle de la culture témoin, à une dilution près, soit 1 ou 2  $\mu\text{g/mL}$  pour les souches FSSC20 et FSSC102 (Tableau 23). Aucune évolution de la résistance au voriconazole n'a été observée lors de cette expérience.

Tableau 23 : Évolution des CMI au voriconazole pour les souches FSSC20 et FSSC102 en présence (VRZ) ou non (témoin) de voriconazole à concentration sub-inhibitrice (NA : non applicable ; ND : données non disponibles)

Génération	CMI ( $\mu\text{g/mL}$ )			
	FSSC20		FSSC102	
	VRZ	Témoin	VRZ	Témoin
0	NA	2	NA	2
1	ND	ND	2	2
2	2	2	2	2
3	1	1	ND	1
4	2	2	2	ND
9	1	1	ND	1

### 7.2.2. Évaluation de la mutagénèse de *CYP51A*

La comparaison des séquences nucléotidiques du gène *CYP51A* et de la protéine codée entre les souches d'origine et les cultures de souche après exposition au voriconazole pendant 14 générations n'a montré aucune différence. Aucune mutation n'a été mise en évidence.

### 7.2.3. Évaluation des variations d'expression de *CYP51A* et *ABC1*

#### 7.2.3.1. *Expression génique de CYP51A*

L'ARN a été extrait à chaque nouvelle génération dans le but d'évaluer de potentielles variations d'expression. Chacune des souches présentait une surexpression du gène *CYP51A*, avec un « fold change » allant respectivement de 23 à 15 287 pour FSSC20, et jusqu'à 1820 pour FSSC102 (Figure 39 et Figure 40).

Bien qu'aucun retentissement phénotypique n'ait été observé, l'exposition au voriconazole induit une surexpression du gène *CYP51A*.

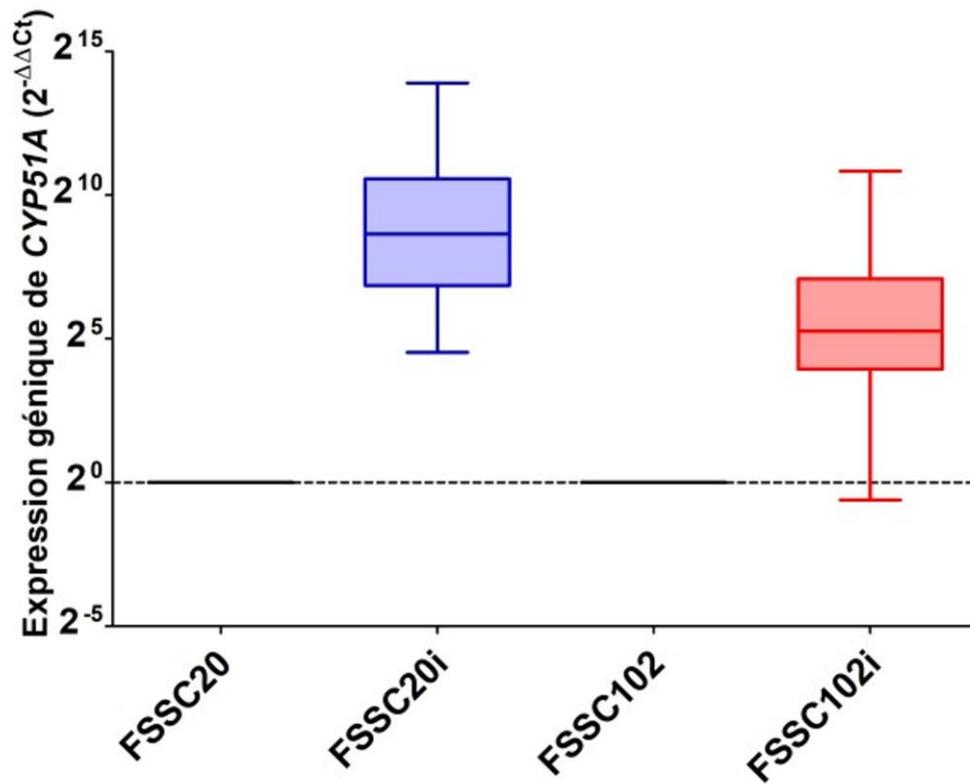


Figure 39 : Répartition du niveau d'expression de l'ARNm *CYP51A* normalisés par *MDP* pour les souches FSSC20 et 102 sur 14 générations en présence ou non de voriconazole (échelle logarithmique log2, trait : médiane, moustaches : valeurs minimales et maximales, i : induction par voriconazole)

Pour chaque génération exposée au voriconazole, l'expression relative de *CYP51A* a été déterminée par RT-qPCR. Les signaux obtenus ont été exprimés par rapport aux contrôles correspondants (fixés à 1 soit 2<sup>0</sup>) sans antifongiques

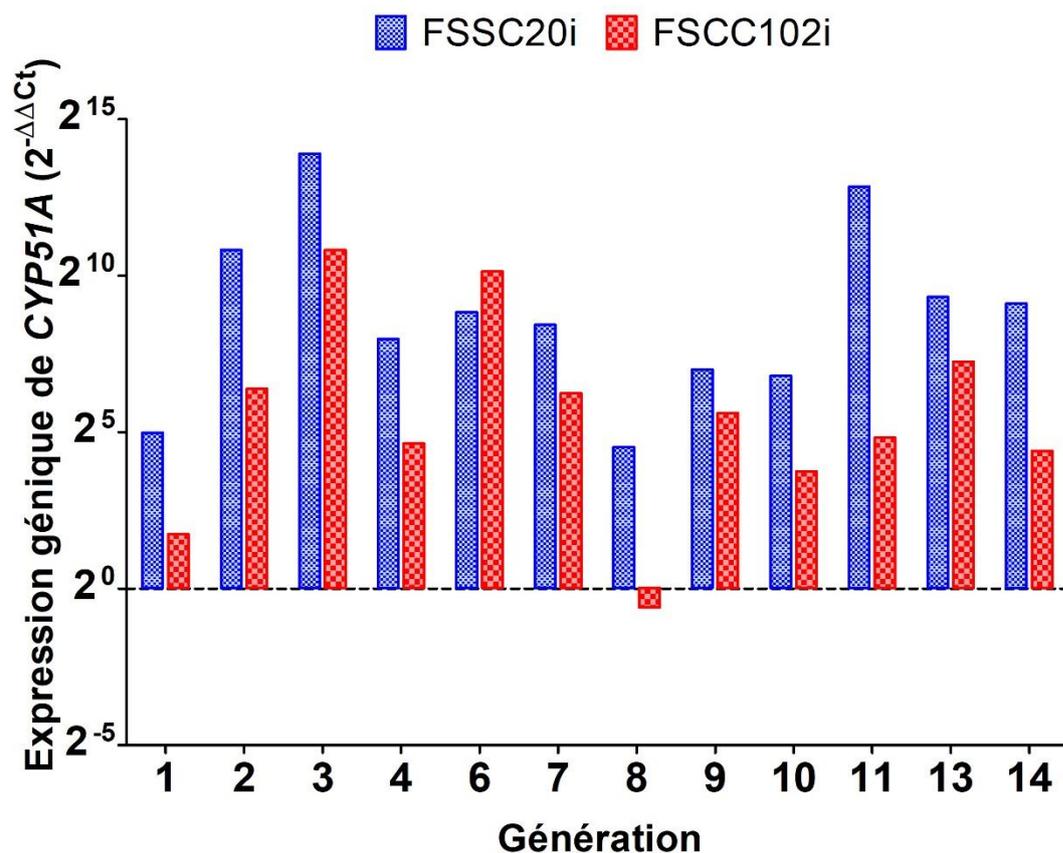


Figure 40 : Évolution de l'expression de *CYP51A* normalisée par *MDP* en cours des générations pour les souches FSSC20 et FSSC102 en présence de voriconazole (échelle logarithmique log<sub>2</sub>, i : induction par voriconazole)

Pour chaque génération cultivée en présence de voriconazole, l'expression relative de *CYP51A* a été déterminée par RT-qPCR. Les signaux obtenus ont été exprimés par rapport aux contrôles correspondants (fixés à 1 soit 2<sup>0</sup>) cultivés sans antifongiques

### 7.2.3.2. Expression génique d'*ABC1*

L'ARN à chaque nouvelle génération a été extrait dans le but d'évaluer de potentielles variations d'expression. Aucune différence significative d'expression génique d'*ABC1* n'a été mise en évidence sur l'ensemble des générations. Chacune des souches présentait une expression variable du gène *ABC1* au cours du temps, avec un « fold change » allant respectivement de 0,7 à 263,5 pour FSSC20, et de 0,03 à 3397 pour FSSC102 (Figure 41).

Les variations d'expression sont représentées par la Figure 42.

Ces résultats sont concordants avec ceux observés lors d'une exposition courte à des concentrations de voriconazole. L'expression du gène *ABC1* ne semble pas être induite par l'exposition à l'antifongique pour des souches présentant une CMI faible à ce dernier, soit 2 µg/mL pour les deux souches testées.

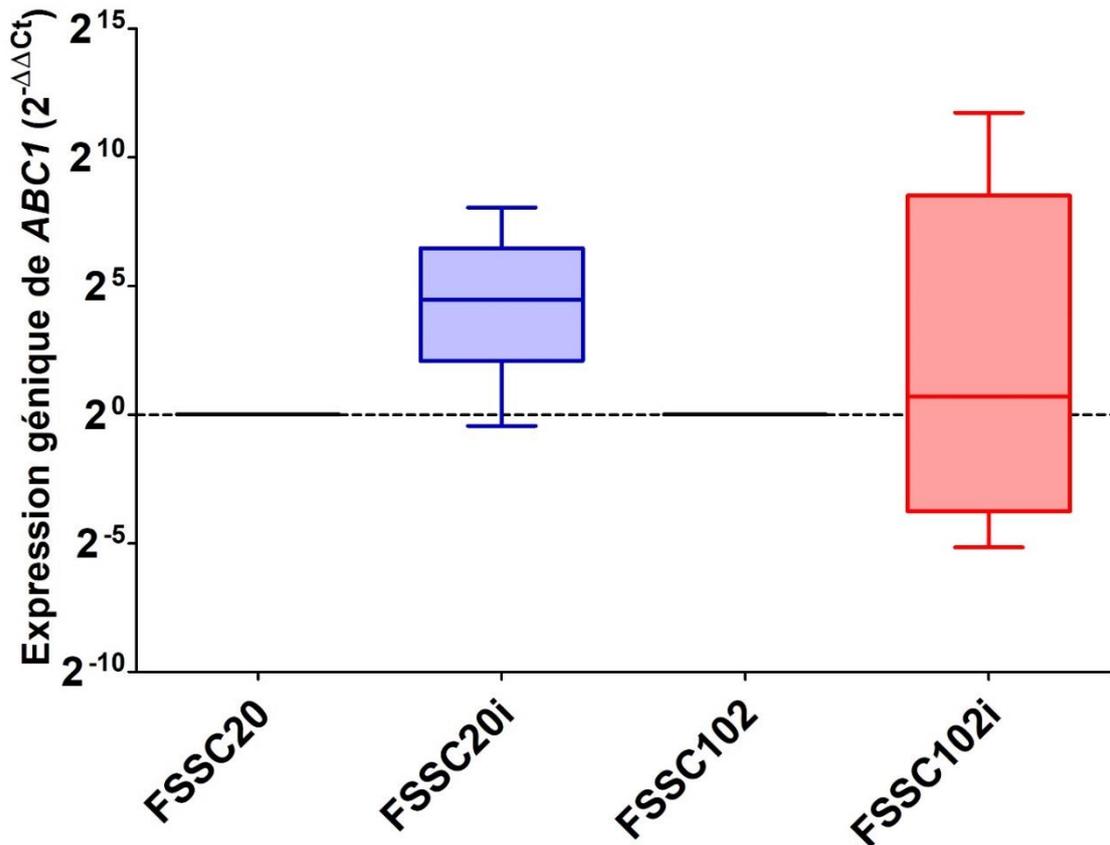


Figure 41 : Répartition du niveau d'expression de l'ARNm *ABC1* normalisée par *MDP* pour les souches FSSC20 et 102 sur 14 générations en présence ou non de voriconazole (échelle logarithmique log<sub>2</sub>, trait : médiane, moustaches : valeurs minimales et maximales, i : induction par voriconazole)

Pour chaque génération cultivée en présence de voriconazole, l'expression relative de *ABC1* a été déterminée par RT-qPCR. Les signaux obtenus ont été exprimés par rapport aux contrôles correspondants (fixés à 1 soit 2<sup>0</sup>) cultivés sans antifongiques

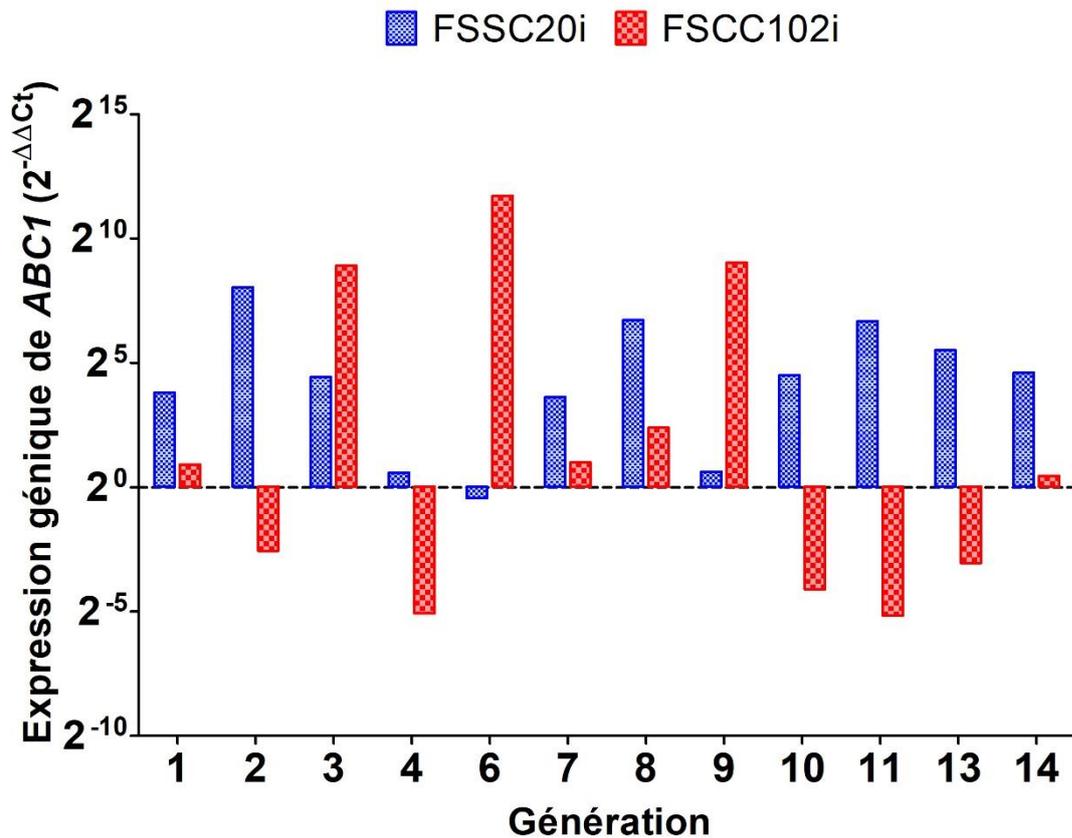


Figure 42 : Évolution de l'expression de *ABC1* normalisée par *MDP* en cours des générations pour les souches FSSC20 et FSSC102 en présence de voriconazole (échelle logarithmique log2, i : induction par voriconazole)

Pour chaque génération cultivée en présence de voriconazole, l'expression relative de *ABC1* a été déterminée par RT-qPCR. Les signaux obtenus ont été exprimés par rapport aux contrôles correspondants (fixés à 1 soit  $2^0$ ) cultivés sans antifongiques

### 7.3. Discussion

L'évolution expérimentale réalisée sur 14 générations n'a pas montré de modification dans la résistance aux azolés pour les souches testées. Aucune modification phénotypique n'a été observée, les valeurs de CMI restant stables sur plusieurs générations pour certaines souches. Ces observations sont en contradiction avec des études réalisées au préalable sur le phénomène d'induction de résistance.

En effet, D'Agostino *et al.* ont montré une évolution des valeurs de CMI entre la première et la troisième génération en présence de voriconazole à concentration sub-inhibitrice, allant de 4 à 16 µg/mL pour *Fusarium solani* [281]. Cette tendance à l'augmentation a également été observée pour d'autres souches fongiques filamenteuses mais également sur des levures. En 2009, l'équipe de Pinto et Silva a montré que la présence d'azolés (fluconazole, voriconazole, posaconazole) en concentration thérapeutique ou sub-inhibitrice induisait une résistance dans le temps sur *Candida parapsilosis* [283]. Suite à l'exposition à des concentrations thérapeutiques, les résultats montrent une variation dans le phénotype de sensibilité au fluconazole uniquement. Il a également été prouvé que la résistance induite par le fluconazole avait un impact plus ou moins important sur le profil de sensibilité des autres azolés. En effet, le fluconazole et le voriconazole ont vu leurs valeurs de CMI augmenter, contrairement au posaconazole, qui a conservé le même phénotype. A l'inverse, le posaconazole n'a induit aucune résistance vis-à-vis des autres azolés. Ces données montrent que l'activité d'induction est variable selon la molécule dans les études utilisant les levures.

Une induction variable a également été observée dans une étude sur *A. fumigatus* [284]. En effet, une culture fongique a été réalisée en présence de concentration sub-inhibitrice en voriconazole et itraconazole. Seules les cultures en présence de voriconazole ont montré une augmentation de la valeur de CMI en fonction du temps passant de 0,125 µg/mL à 8 µg/mL. Aucune variation de CMI n'a été objectivée pour les cultures avec itraconazole. De plus aucune mutation dans les gènes *CYP51A* et *CYP51B* n'a été mise en évidence pouvant expliquer cette résistance *de novo* au voriconazole chez *A. fumigatus*.

L'évaluation de la mutagenèse des souches de *Fusarium* utilisées pour la présente étude n'a mis en évidence aucune mutation au niveau de *CYP51A*. Il n'existe pas, à notre connaissance, d'études ayant évalué la mutagenèse du gène *CYP51A* chez *Fusarium* après exposition à un azolé. Cependant, une étude réalisée sur *A. fumigatus* a sélectionné des souches ayant muté au niveau du gène *CYP51A* après exposition à l'itraconazole sur 5 générations. En comparaison de leurs souches parentales, les mutants présentaient des CMI plus élevées à l'itraconazole et au posaconazole. L'effet des mutations sur les CMI au voriconazole était moins marqué, avec une variation entre 1 et 2 dilutions [285].

À défaut d'une mutagenèse sur le gène cible, l'expression du gène *CYP51A* a été étudiée sur l'ensemble des différentes générations, à l'exception des générations G5 et G12, afin d'observer une potentielle induction d'expression génique. En effet, l'expression du gène d'intérêt

*CYP51A* impliqué dans la résistance aux azolés peut être modifiée en présence de l'inhibiteur de l'enzyme, comme il a déjà été décrit dans la littérature [267]. Le choix du gène de référence est important pour tout résultat de RT-PCR quantitative car il sert à normaliser les résultats obtenus.

Cependant des études ont montré que certains gènes de référence pouvaient varier en fonction des conditions expérimentales et que l'utilisation de deux, ou plus, gènes de référence permettait une meilleure normalisation [286,287]. Des outils informatiques ont d'ailleurs été créés pour rechercher le ou les gènes de référence ayant la meilleure stabilité d'expression, comme le programme GeNorm de Vandesompele *et al.* [287] ou l'algorithme NormFinder d'Andersen *et al.* [271]. Des travaux ont déjà été réalisés sur d'autres organismes afin d'évaluer et de choisir le gène de référence le plus stable en fonction des conditions expérimentales de l'étude [288].

Dans la littérature, de nombreux gènes contrôle ont déjà été décrits et utilisés dans des expériences impliquant *Fusarium* [136,138,249,268,269,289,290]. Cependant, à ce jour, aucune étude n'a évalué la stabilité de ces gènes de référence en fonction de différents paramètres de culture (température, milieu de culture, présence d'antifongique, ...). L'évaluation réalisée au cours de ces travaux a mis en évidence le loci *MDP* correspondant au gène codant la Mannitol 1P déshydrogénase, comme étant le gène le plus stable dans les différentes conditions de culture.

Les résultats montrent une surexpression du gène *CYP51A* pour les cultures en présence de voriconazole par rapport aux cultures témoins. Cette surexpression est toujours présente quelle que soit la génération ou la souche, mais elle n'évolue pas en fonction du temps de génération de la souche. Des études sur le complexe d'espèces *Fusarium solani* ont également montré une augmentation du niveau d'expression du gène *CYP51A* suite à une exposition au voriconazole pour différentes concentrations. Cette surexpression était significative et également observée en présence d'autres antifongiques azolés. Il a également été démontré que les niveaux d'expression basaux de l'ARNm *CYP51A* étaient corrélés à la valeur de la CMI de la souche. Les isolats à CMI faible exprimaient environ 4 fois moins que ceux à CMI élevées [249,267].

Une autre étude a également évalué les conséquences d'une exposition à un azolé sur une souche appartenant au complexe d'espèces *Fusarium oxysporum*. L'équipe a montré qu'il existait une surexpression en présence de penconazole, antifongique utilisé en agriculture, et

que celle-ci semblait être corrélée à la concentration d'antifongique utilisée. Plus la concentration non létale était élevée, plus l'expression du gène *CYP51A* était importante. Les mêmes observations de stabilité dans le temps ont été mises en évidence. Cependant, aucune résistance n'est apparue pendant toute la durée de l'exposition à l'antifongique. Selon les auteurs, cette surexpression du gène *CYP51A* sans association à une résistance semblerait être un mécanisme d'adaptation de *Fusarium* au composé toxique [291].

Le mécanisme impliqué dans la surexpression de *CYP51A* a déjà décrit chez *Aspergillus fumigatus*. En plus des mutations ponctuelles, les modifications de la région promotrice du gène *CYP51A* peuvent être responsables de la résistance aux azolés. L'insertion de répétitions en tandem (tandem repeat TR) ou autres éléments transposables entraînent une augmentation du niveau d'expression de *CYP51A*. Il a été démontré que l'association de la répétition en tandem de 34 paires de bases (TR34) à une substitution de lysine en histidine au codon 98 (TR34/L98H) induisait une élévation de l'expression de *CYP51A* jusqu'à huit fois la normale [292,293].

L'étude de la séquence du promoteur du gène *CYP51A* serait intéressante à réaliser sur le panel de souches FSSC étudiées. En effet, l'équipe de recherche de James *et al.* a montré qu'un lien pouvait exister entre une mutation au niveau du promoteur de *CYP51A* et des CMI élevées au voriconazole chez *Fusarium solani*. En effet, 9 isolats de FSSC sur 19 montraient des valeurs de CMI supérieures à 32 µg/mL. Tous présentaient une délétion de 23 paires de base au niveau du promoteur, alors que cette variation était absente dans les 10 autres souches ayant des CMI faibles ( $\leq 12$  mg/l). De plus, cette délétion a été retrouvée parmi des isolats environnementaux et cliniques [249].

Des études complémentaires sur les souches de cette étude permettraient de consolider ces observations et peut-être de mieux appréhender la grande variabilité de CMI au voriconazole.



**CONCLUSION**

**ET**

**PERSPECTIVES**



Le genre *Fusarium* est composé de champignons filamenteux que l'on retrouve dans de nombreuses sphères écologiques, comme le sol, l'eau et l'air. Principalement connu comme phytopathogène et responsable de pertes agricoles et céréalières, *Fusarium* est décrit également comme agent d'infections fongiques chez l'Homme depuis les dernières décennies. Au sein du genre *Fusarium*, le complexe d'espèces *Fusarium solani* représente plus de la moitié des isolats de *Fusarium* responsables d'infections fongiques. Pouvant être superficielles, comme des atteintes unguéales, les infections causées par le complexe FSSC peuvent également être profondes, avec une dissémination hématogène pouvant être mortelle.

L'arsenal thérapeutique pour le traitement des fusarioses est très limité. Le traitement de référence des fusarioses est le voriconazole, plus ou moins associé à l'amphotéricine B. Cependant, la prise en charge thérapeutique est complexe du fait de la variabilité des CMI au voriconazole au sein du complexe mais également de l'absence de corrélation entre les effets observés *in vitro* et ceux *in vivo*.

Dans un premier temps, la variabilité de CMI au voriconazole mais également à d'autres azolés a été mise en évidence pour les différentes souches de *F. solani* utilisées dans cette étude. Les souches ont été classées en deux groupes selon leurs valeurs de CMI au voriconazole. Les études de croissance *in vitro* ont montré que les souches présentaient une croissance qui leur était spécifique mais indépendante de leur niveau de résistance au voriconazole.

Cependant, le modèle *in vivo* utilisant *Galleria mellonella* a mis en évidence une tendance au « fitness cost » entre virulence et résistance aux antifongiques. En effet, les souches de *Fusarium solani* résistantes au voriconazole (CMI 8-16 µg/mL) présentaient une virulence plus faible que celles ayant une CMI plus basse au voriconazole, bien que non différentes statistiquement. A l'inverse, une différence de virulence a également été observée entre les isolats d'origine clinique et ceux d'origine environnementale.

De plus, le traitement par voriconazole d'une infection à *Fusarium solani* sur modèle *in vivo* avec *G. mellonella* ne montre pas de bénéfice en terme de survie, quel que soit le profil de sensibilité de la souche à l'antifongique.

Dans un deuxième temps, l'étude des mécanismes de résistance a été entreprise afin de comprendre la diminution de sensibilité au voriconazole chez FSSC. Une première approche a évalué les modifications qualitatives à la recherche de mutations au niveau des 3 isoformes de CYP51, cibles de l'antifongique. Des variations de séquence protéique de CYP51A, l'isoforme majoritairement impliquée dans la synthèse de l'ergostérol, dessinaient différents profils protéiques au sein des isolats étudiés. La classification des souches en fonction de la similarité de profils a mis en évidence un potentiel lien avec la valeur de CMI au voriconazole. En effet, les souches partageant une séquence protéique identique ou très proche, présentent entre elles une valeur de CMI proche.

Parmi les mutations connues chez *Aspergillus fumigatus* comme responsables de la résistance aux azolés, 5 ont été retrouvées au sein du panel de souches et l'acide aminé muté était commun à l'ensemble des isolats. La modélisation tridimensionnelle a mis en évidence l'impact de certains points de mutation sur l'interaction enzyme-substrat. En effet, nous avons observé que l'acide aminé leucine en position 218 était situé à l'entrée du canal du substrat. La comparaison de la séquence de la protéine CYP51A des souches de notre étude avec d'autres souches du même complexe et de différents complexes a montré que ce résidu L218 était conservé pour l'ensemble du genre *Fusarium*. Ainsi, le résidu L218 serait directement impliqué dans la discrimination de l'azolé en modifiant la forme de l'entrée du canal du substrat. Cette observation, à confirmer grâce à d'autres études, pourrait être un premier indice pour expliquer la faible sensibilité des antifongiques azolés utilisés en clinique pour le genre *Fusarium*. D'autres études approfondies sur l'ensemble des interactions au sein de la conformation tridimensionnelle des différentes variations en acides aminés permettraient de mieux appréhender la différence de profils protéiques, comme les différents points de mutation, en lien avec la variabilité de la valeur de CMI au voriconazole.

L'exposition au voriconazole sur plusieurs générations n'a pas entraîné l'apparition de nouvelles mutations au sein de la séquence protéique de CYP51A.

Dans un troisième temps, la recherche de possibles modifications quantitatives, soit une surexpression du gène *CYP51A* pouvant expliquer la résistance aux azolés, a été réalisée. Il

semblerait que l'expression de *CYP51A* puisse être induite en présence de voriconazole. Cette surexpression ne présente cependant aucun impact phénotypique sur la souche, celle-ci conserve sa valeur initiale de CMI au voriconazole. Une approche complémentaire sur le rôle du promoteur du gène *CYP51A* serait intéressante. En effet, l'expression peut être fortement influencée par des mutations au sein de cette région, entraînant des phénotypes de résistance.

Dans un quatrième temps, les phénomènes d'efflux décrits dans la littérature ont été en partie abordés par ce travail. L'expression du gène *ABC1* codant un transporteur énergie dépendant et impliqué dans l'efflux de nombreuses molécules, comme les azolés, a été évaluée sur différentes souches présentant des CMI variables, exposées au voriconazole à différents temps. Il a été montré que plus la souche présentait une CMI élevée, plus celle-ci surexprimait le gène *ABC1*. Contrairement à *CYP51A*, *ABC1* semble être induit par la présence d'antifongiques de type azolé.

Ainsi, nous pouvons émettre l'hypothèse que la faible sensibilité naturelle du genre *Fusarium* serait due à une modification de la cible, impliquant une difficulté d'accès plus grande des antifongiques azolés au site actif de la 14 alpha déméthylase. De plus, un mécanisme d'efflux du voriconazole touchant les souches présentant les CMI les plus fortes expliquerait les variabilités de sensibilité.

L'ensemble des travaux menés lors de cette thèse d'Université a apporté de nouvelles connaissances quant à la résistance du complexe d'espèces *Fusarium solani* au voriconazole. Ces résultats ont également permis d'élaborer de nouvelles orientations pour de futures études sur ce phénomène, afin de mieux appréhender la prise en charge complexe des infections fongiques à *Fusarium solani*.



# BIBLIOGRAPHIE



1. Abdel-Azeem, A.M.; Abdel-Azeem, M.A.; Darwish, A.G.; Nafady, N.A.; Ibrahim, N.A. Fusarium: Biodiversity, Ecological Significances, and Industrial Applications. In *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi: Volume 1: Diversity and Enzymes Perspectives*; Yadav, A.N., Mishra, S., Singh, S., Gupta, A., Eds.; Fungal Biology; Springer International Publishing: Cham, 2019; pp. 201–261.
2. 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**, *32*, 1491–1500.
3. Lazarus, J.A.; Schwarz, L.H. Infestation of Urinary Bladder with an Unusual Fungus Strain, Fusarium. *Urol. Cutan. Rev.* **1948**, *52*, 185–189.
4. Mikami, R.; Stemmermann, G.N. Keratomycosis Caused by Fusarium Oxysporum. *Am. J. Clin. Pathol.* **1958**, *29*, 257–262.
5. *Fusarium: Genomics, Molecular and Cellular Biology*; Daren W. Brown and Robert H. Proctor, Ed.; Caister Academic Press, 2013;
6. Wollenweber, H.W.; Reinking, O.A. *Die Fusarien: ihre Beschreibung, Schadwirkung und Bekämpfung*; P. Parey, [J.W. Edward]: Berlin, [Ann Arbor, Mich.], 1935;
7. Nirenberg, H.I.; O'Donnell, K. New Fusarium Species and Combinations within the Gibberella Fujikuroi Species Complex. *Mycologia* **1998**, *90*, 434–458.
8. O'Donnell, K.; Al-Hatmi, A.M.S.; Aoki, T.; Brankovics, B.; Cano-Lira, J.F.; Coleman, J.J.; de Hoog, G.S.; Di Pietro, A.; Frandsen, R.J.N.; Geiser, D.M.; et al. No to Neocosmospora: Phylogenomic and Practical Reasons for Continued Inclusion of the Fusarium Solani Species Complex in the Genus Fusarium. *mSphere* **2020**, *5*, e00810-20.
9. Crous, P.W.; Lombard, L.; Sandoval-Denis, M.; Seifert, K.A.; Schroers, H.-J.; Chaverri, P.; Gené, J.; Guarro, J.; Hirooka, Y.; Bensch, K.; et al. Fusarium: More than a Node or a Foot-Shaped Basal Cell. *Stud. Mycol.* **2021**, *98*, 100116.
10. Geiser, D.M.; Al-Hatmi, A.M.S.; Aoki, T.; Arie, T.; Balmas, V.; Barnes, I.; Bergstrom, G.C.; Bhattacharyya, M.K.; Blomquist, C.L.; Bowden, R.L.; et al. Phylogenomic Analysis of a 55.1-Kb 19-Gene Dataset Resolves a Monophyletic Fusarium That Includes the Fusarium Solani Species Complex. *Phytopathology* **2021**, *111*, 1064–1079.
11. de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Ahmed S, Al-Hatmi AMS, Figueras MJ, Vitale RG *Atlas of Clinical Fungi*; 4th ed.; Hilversum, 2020;
12. *The Fusarium Laboratory Manual*; Leslie, J.F., Summerell, B.A., Eds.; 1st ed.; Wiley, 2006;
13. Summerell, B.A.; Salleh, B.; Leslie, J.F. A Utilitarian Approach to Fusarium Identification. *Plant Dis.* **2003**, *87*, 117–128.
14. Šišić, A.; Baćanović-Šišić, J.; Al-Hatmi, A.M.S.; Karlovsky, P.; Ahmed, S.A.; Maier, W.; de Hoog, G.S.; Finckh, M.R. The “forma Specialis” Issue in Fusarium: A Case Study in Fusarium Solani f. Sp. *Pisi. Sci. Rep.* **2018**, *8*, 1252.

15. Pérez-Hernández, A.; Rocha, L.O.; Porcel-Rodríguez, E.; Summerell, B.A.; Liew, E.C.Y.; Gómez-Vázquez, J.M. Pathogenic, Morphological, and Phylogenetic Characterization of *Fusarium Solani* f. Sp. Cucurbitae Isolates From Cucurbits in Almería Province, Spain. *Plant Dis.* **2020**, *104*, 1465–1476.
16. Teunissen, H. a. S.; Verkooijen, J.; Cornelissen, B.J.C.; Haring, M.A. Genetic Exchange of Avirulence Determinants and Extensive Karyotype Rearrangements in Parasexual Recombinants of *Fusarium Oxysporum*. *Mol. Genet. Genomics MGG* **2002**, *268*, 298–310.
17. Davière, J.M.; Langin, T.; Daboussi, M.J. Potential Role of Transposable Elements in the Rapid Reorganization of the *Fusarium Oxysporum* Genome. *Fungal Genet. Biol. FG B* **2001**, *34*, 177–192.
18. Coleman, J.J. The *Fusarium Solani* Species Complex: Ubiquitous Pathogens of Agricultural Importance. *Mol. Plant Pathol.* **2016**, *17*, 146–158.
19. Covert, S.F.; Enkerli, J.; Miao, V.P.; VanEtten, H.D. A Gene for Maackiain Detoxification from a Dispensable Chromosome of *Nectria Haematococca*. *Mol. Gen. Genet. MGG* **1996**, *251*, 397–406.
20. Ma, L.-J.; van der Does, H.C.; Borkovich, K.A.; Coleman, J.J.; Daboussi, M.-J.; Di Pietro, A.; Dufresne, M.; Freitag, M.; Grabherr, M.; Henrissat, B.; et al. Comparative Genomics Reveals Mobile Pathogenicity Chromosomes in *Fusarium*. *Nature* **2010**, *464*, 367–373.
21. Coleman, J.J.; Rounsley, S.D.; Rodriguez-Carres, M.; Kuo, A.; Wasmann, C.C.; Grimwood, J.; Schmutz, J.; Taga, M.; White, G.J.; Zhou, S.; et al. The Genome of *Nectria Haematococca*: Contribution of Supernumerary Chromosomes to Gene Expansion. *PLOS Genet.* **2009**, *5*, e1000618.
22. Han, Y.; Liu, X.; Benny, U.; Kistler, H.C.; VanEtten, H.D. Genes Determining Pathogenicity to Pea Are Clustered on a Supernumerary Chromosome in the Fungal Plant Pathogen *Nectria Haematococca*. *Plant J. Cell Mol. Biol.* **2001**, *25*, 305–314.
23. Nelson, P.E.; Dignani, M.C.; Anaissie, E.J. Taxonomy, Biology, and Clinical Aspects of *Fusarium* Species. *Clin. Microbiol. Rev.* **1994**, *7*, 479–504.
24. Swathi, J.; Sowjanya, K.M.; Narendra, K.; Satya, A.K. Bioactivity Assay of an Isolated Marine *Fusarium* Sps. In Proceedings of the International Journal of Bio-Science and Bio-Technology; October 31 2013; Vol. 5, pp. 179–186.
25. Palmero, D.; Rodríguez, J.M.; de Cara, M.; Camacho, F.; Iglesias, C.; Tello, J.C. Fungal Microbiota from Rain Water and Pathogenicity of *Fusarium* Species Isolated from Atmospheric Dust and Rainfall Dust. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *38*, 13–20.
26. Tupaki-Sreepurna, A.; Kindo, A.J. *Fusarium*: The Versatile Pathogen. *Indian J. Med. Microbiol.* **2018**, *36*, 8–17.
27. Hoh, D.Z.; Lee, H.-H.; Wada, N.; Liu, W.-A.; Lu, M.R.; Lai, C.-K.; Ke, H.-M.; Sun, P.-F.; Tang, S.-L.; Chung, W.-H.; et al. Comparative Genomic and Transcriptomic Analyses of Trans-Kingdom Pathogen *Fusarium Solani* Species Complex Reveal Degrees of Compartmentalization. *BMC Biol.* **2022**, *20*, 236.

28. Mongrain, D.; Couture, L.; Comeau, A. Natural Occurrence of *Fusarium Graminearum* on Adult Wheat Midge and Transmission to Wheat Spikes. *Cereal Res. Commun.* **2000**, *28*, 173–180.
29. Dean, R.; Van Kan, J.A.L.; Pretorius, Z.A.; Hammond-Kosack, K.E.; Di Pietro, A.; Spanu, P.D.; Rudd, J.J.; Dickman, M.; Kahmann, R.; Ellis, J.; et al. The Top 10 Fungal Pathogens in Molecular Plant Pathology. *Mol. Plant Pathol.* **2012**, *13*, 414–430.
30. O'Donnell, K.; Kistler, H.C.; Cigelnik, E.; Ploetz, R.C. Multiple Evolutionary Origins of the Fungus Causing Panama Disease of Banana: Concordant Evidence from Nuclear and Mitochondrial Gene Genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1998**, *95*, 2044–2049.
31. Cabañes, F.J.; Alonso, J.M.; Castellá, G.; Alegre, F.; Domingo, M.; Pont, S. Cutaneous Hyalohyphomycosis Caused by *Fusarium Solani* in a Loggerhead Sea Turtle (*Caretta Caretta* L.). *J. Clin. Microbiol.* **1997**, *35*, 3343–3345.
32. Brown, T.; Millar, Z.; Evans, D.; Pham, P.H.; LePage, V.; Lumsden, J.S. *Fusarium Solani* Haplotype 12-b and Aortic and Branchial Arteritis in *Hippocampus Erectus* Perry. *J. Fish Dis.* **2020**, *43*, 301–304.
33. Kano, R.; Okayama, T.; Hamamoto, M.; Nagata, T.; Ohno, K.; Tsujimoto, H.; Nakayama, H.; Doi, K.; Fujiwara, K.; Hasegawa, A. Isolation of *Fusarium Solani* from a Dog: Identification by Molecular Analysis. *Med. Mycol.* **2002**, *40*, 435–437.
34. O'Donnell, K.; Sutton, D.A.; Wiederhold, N.; Robert, V.A.R.G.; Crous, P.W.; Geiser, D.M. Veterinary Fusarioses within the United States. *J. Clin. Microbiol.* **2016**, *54*, 2813–2819.
35. Fisher, M.C.; Henk, D.A.; Briggs, C.J.; Brownstein, J.S.; Madoff, L.C.; McCraw, S.L.; Gurr, S.J. Emerging Fungal Threats to Animal, Plant and Ecosystem Health. *Nature* **2012**, *484*, 186–194.
36. Nucci, M.; Anaissie, E. *Fusarium* Infections in Immunocompromised Patients. *Clin. Microbiol. Rev.* **2007**, *20*, 695–704.
37. Stempel, J.M.; Hammond, S.P.; Sutton, D.A.; Weiser, L.M.; Marty, F.M. Invasive Fusariosis in the Voriconazole Era: Single-Center 13-Year Experience. *Open Forum Infect. Dis.* **2015**, *2*, ofv099.
38. Zhang, N.; O'Donnell, K.; Sutton, D.A.; Nalim, F.A.; Summerbell, R.C.; Padhye, A.A.; Geiser, D.M. Members of the *Fusarium Solani* Species Complex That Cause Infections in Both Humans and Plants Are Common in the Environment. *J. Clin. Microbiol.* **2006**, *44*, 2186–2190.
39. Short, D.P.G.; O'Donnell, K.; Zhang, N.; Juba, J.H.; Geiser, D.M. Widespread Occurrence of Diverse Human Pathogenic Types of the Fungus *Fusarium* Detected in Plumbing Drains. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 4264–4272.
40. Ripert Christian *Mycologie médicale*; TEC & DOC, 2013;
41. Ekwomadu, T.I.; Akinola, S.A.; Mwanza, M. *Fusarium* Mycotoxins, Their Metabolites (Free, Emerging, and Masked), Food Safety Concerns, and Health Impacts. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2021**, *18*, 11741.

42. Yazar, S.; Omurtag, G.Z. Fumonisin, Trichothecenes and Zearalenone in Cereals. *Int. J. Mol. Sci.* **2008**, *9*, 2062–2090.
43. Bennett, J.W.; Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **2003**, *16*, 497–516.
44. Shay, R.; Wiegand, A.A.; Trail, F. Biofilm Formation and Structure in the Filamentous Fungus *Fusarium Graminearum*, a Plant Pathogen. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10*, e0017122.
45. Sav, H.; Rafati, H.; Öz, Y.; Dalyan-Cilo, B.; Ener, B.; Mohammadi, F.; Ilkit, M.; van Diepeningen, A.D.; Seyedmousavi, S. Biofilm Formation and Resistance to Fungicides in Clinically Relevant Members of the Fungal Genus *Fusarium*. *J. Fungi* **2018**, *4*, 16.
46. Córdova-Alcántara, I.M.; Venegas-Cortés, D.L.; Martínez-Rivera, M.Á.; Pérez, N.O.; Rodríguez-Tovar, A.V. Biofilm Characterization of *Fusarium Solani* Keratitis Isolate: Increased Resistance to Antifungals and UV Light. *J. Microbiol. Seoul Korea* **2019**, *57*, 485–497.
47. Mayayo, E.; Pujol, I.; Guarro, J. Experimental Pathogenicity of Four Opportunist *Fusarium* Species in a Murine Model. *J. Med. Microbiol.* **1999**, *48*, 363–366.
48. Coleman, J.J.; Muhammed, M.; Kasperkovitz, P.V.; Vyas, J.M.; Mylonakis, E. *Fusarium* Pathogenesis Investigated Using *Galleria Mellonella* as a Heterologous Host. *Fungal Biol.* **2011**, *115*, 1279–1289.
49. Onychomycoses : Modalités de Diagnostic et Prise En Charge 2007, 134:5S7-16.
50. Christenson, J.K.; Peterson, G.M.; Naunton, M.; Bushell, M.; Kosari, S.; Baby, K.E.; Thomas, J. Challenges and Opportunities in the Management of Onychomycosis. *J. Fungi* **2018**, *4*, 87.
51. Vender, R.B.; Lynde, C.W.; Poulin, Y. Prevalence and Epidemiology of Onychomycosis. *J. Cutan. Med. Surg.* **2006**, *10*, S28–S33.
52. Sigurgeirsson, B.; Baran, R. The Prevalence of Onychomycosis in the Global Population – A Literature Study. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2014**, *28*, 1480–1491.
53. Moreno, G.; Arenas, R. Other Fungi Causing Onychomycosis. *Clin. Dermatol.* **2010**, *28*, 160–163.
54. Nucci, M.; Varon, A.G.; Garnica, M.; Akiti, T.; Barreiros, G.; Trope, B.M.; Nouér, S.A. Increased Incidence of Invasive Fusariosis with Cutaneous Portal of Entry, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* **2013**, *19*, 1567–1572.
55. Uemura, E.V.G.; Barbosa, M. dos S.; Simionatto, S.; Al-Harrasi, A.; Al-Hatmi, A.M.S.; Rossato, L. Onychomycosis Caused by *Fusarium* Species. *J. Fungi* **2022**, *8*, 360.
56. Ranawaka, R.R.; Nagahawatte, A.; Gunasekara, T.A. *Fusarium* Onychomycosis: Prevalence, Clinical Presentations, Response to Itraconazole and Terbinafine Pulse Therapy, and 1-Year Follow-up in Nine Cases. *Int. J. Dermatol.* **2015**, *54*, 1275–1282.
57. Baran, R.; Faergemann, J.; Hay, R.J. Superficial White Onychomycosis--a Syndrome with Different Fungal Causes and Paths of Infection. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, *57*, 879–882.

58. Leung, A.K.C.; Lam, J.M.; Leong, K.F.; Hon, K.L.; Barankin, B.; Leung, A.A.M.; Wong, A.H.C. Onychomycosis: An Updated Review. *Inflamm. Allergy Drug Targets* **2020**, *14*, 32–45.
59. Acharya, Y.; Acharya, B.; Karki, P. Fungal Keratitis: Study of Increasing Trend and Common Determinants. *Nepal J. Epidemiol.* **2017**, *7*, 685–693.
60. Ahmadikia, K.; Aghaei Gharebolagh, S.; Fallah, B.; Naeimi Eshkaleti, M.; Malekifar, P.; Rahsepar, S.; Getso, M.I.; Sharma, S.; Mahmoudi, S. Distribution, Prevalence, and Causative Agents of Fungal Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis (1990 to 2020). *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, *11*, 698780.
61. Ting, D.S.J.; Ho, C.S.; Deshmukh, R.; Said, D.G.; Dua, H.S. Infectious Keratitis: An Update on Epidemiology, Causative Microorganisms, Risk Factors, and Antimicrobial Resistance. *Eye* **2021**, *35*, 1084–1101.
62. Ting, D.S.J.; Ho, C.S.; Cairns, J.; Elsahn, A.; Al-Aqaba, M.; Boswell, T.; Said, D.G.; Dua, H.S. 12-Year Analysis of Incidence, Microbiological Profiles and in Vitro Antimicrobial Susceptibility of Infectious Keratitis: The Nottingham Infectious Keratitis Study. *Br. J. Ophthalmol.* **2021**, *105*, 328–333.
63. Tam, A.L.C.; Côté, E.; Saldanha, M.; Lichtinger, A.; Slomovic, A.R. Bacterial Keratitis in Toronto: A 16-Year Review of the Microorganisms Isolated and the Resistance Patterns Observed. *Cornea* **2017**, *36*, 1528–1534.
64. Green, M.; Carnt, N.; Apel, A.; Stapleton, F. Queensland Microbial Keratitis Database: 2005-2015. *Br. J. Ophthalmol.* **2019**, *103*, 1481–1486.
65. Politis, M.; Wajnsztajn, D.; Rosin, B.; Block, C.; Solomon, A. Trends of Bacterial Keratitis Culture Isolates in Jerusalem; a 13- Years Analysis. *PloS One* **2016**, *11*, e0165223.
66. Hernandez-Camarena, J.C.; Graue-Hernandez, E.O.; Ortiz-Casas, M.; Ramirez-Miranda, A.; Navas, A.; Pedro-Aguilar, L.; Lopez-Espinosa, N.L.; Gaona-Juarez, C.; Bautista-Hernandez, L.A.; Bautista-de Lucio, V.M. Trends in Microbiological and Antibiotic Sensitivity Patterns in Infectious Keratitis: 10-Year Experience in Mexico City. *Cornea* **2015**, *34*, 778–785.
67. Kredics, L.; Narendran, V.; Shobana, C.S.; Vágvölgyi, C.; Manikandan, P.; Indo-Hungarian Fungal Keratitis Working Group Filamentous Fungal Infections of the Cornea: A Global Overview of Epidemiology and Drug Sensitivity. *Mycoses* **2015**, *58*, 243–260.
68. Brown, L.; Leck, A.K.; Gichangi, M.; Burton, M.J.; Denning, D.W. The Global Incidence and Diagnosis of Fungal Keratitis. *Lancet Infect. Dis.* **2021**, *21*, e49–e57.
69. Castano, G.; Elnahry, A.G.; Mada, P.K. Fungal Keratitis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023.
70. Epstein, A.B. In the Aftermath of the Fusarium Keratitis Outbreak: What Have We Learned? *Clin. Ophthalmol. Auckl. NZ* **2007**, *1*, 355–366.

71. Gower, E.W.; Keay, L.J.; Oechsler, R.A.; Iovieno, A.; Alfonso, E.C.; Jones, D.B.; Colby, K.; Tuli, S.S.; Patel, S.R.; Lee, S.M.; et al. Trends in Fungal Keratitis in the United States, 2001 to 2007. *Ophthalmology* **2010**, *117*, 2263–2267.
72. Gopinathan, U.; Ramakrishna, T.; Willcox, M.; Rao, C.M.; Balasubramanian, D.; Kulkarni, A.; Vemuganti, G.K.; Rao, G.N. Enzymatic, Clinical and Histologic Evaluation of Corneal Tissues in Experimental Fungal Keratitis in Rabbits. *Exp. Eye Res.* **2001**, *72*, 433–442.
73. Sharma, N.; Bagga, B.; Singhal, D.; Nagpal, R.; Kate, A.; Saluja, G.; Maharana, P.K. Fungal Keratitis: A Review of Clinical Presentations, Treatment Strategies and Outcomes. *Ocul. Surf.* **2022**, *24*, 22–30.
74. Atta, S.; Perera, C.; Kowalski, R.P.; Jhanji, V. Fungal Keratitis: Clinical Features, Risk Factors, Treatment, and Outcomes. *J. Fungi* **2022**, *8*, 962.
75. Szaliński, M.; Zgryźniak, A.; Rubisz, I.; Gajdzis, M.; Kaczmarek, R.; Przeździecka-Dołyk, J. Fusarium Keratitis—Review of Current Treatment Possibilities. *J. Clin. Med.* **2021**, *10*, 5468.
76. Develoux, M. Les mycétomes et leur traitement. *J. Mycol. Médicale* **2016**, *26*, 77–85.
77. Sande, W.W.J. van de Global Burden of Human Mycetoma: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2013**, *7*, e2550.
78. Nenoff, P.; van de Sande, W. w. j.; Fahal, A. h.; Reinel, D.; Schöfer, H. Eumycetoma and Actinomycetoma – an Update on Causative Agents, Epidemiology, Pathogenesis, Diagnostics and Therapy. *J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.* **2015**, *29*, 1873–1883.
79. Al-Hatmi, A.M.S.; Bonifaz, A.; Tirado-Sánchez, A.; Meis, J.F.; de Hoog, G.S.; Ahmed, S.A. Fusarium Species Causing Eumycetoma: Report of Two Cases and Comprehensive Review of the Literature. *Mycoses* **2017**, *60*, 204–212.
80. Yera, H.; Bounoux, M.E.; Jeanrot, C.; Baixench, M.T.; De Pinieux, G.; Dupouy-Camet, J. Mycetoma of the Foot Caused by Fusarium Solani: Identification of the Etiologic Agent by DNA Sequencing. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 1805–1808.
81. Tomimori-Yamashita, J.; Ogawa, M.M.; Hirata, S.H.; Fischman, O.; Michalany, N.S.; Yamashita, H.K.; Alchorne, M. Mycetoma Caused by Fusarium Solani with Osteolytic Lesions on the Hand: Case Report. *Mycopathologia* **2002**, *153*, 11–14.
82. Correia, C.; Ferreira, J.; Soares-de-Almeida, L.; Filipe, P. An Unusual Cause of Eumycetoma - Fusarium Solani Keratoplasticum. *Actas Dermosifiliogr.* **2022**, *113*, 899.
83. Gupta, A.K.; Baran, R.; Summerbell, R.C. Fusarium Infections of the Skin. *Curr. Opin. Infect. Dis.* **2000**, *13*, 121–128.
84. Brasch, J. [Skin infections caused by Fusarium]. *Hautarzt Z. Dermatol. Venerol. Verwandte Geb.* **2012**, *63*, 872–876.
85. Nucci, M.; Anaissie, E. Cutaneous Infection by Fusarium Species in Healthy and Immunocompromised Hosts: Implications for Diagnosis and Management. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2002**, *35*, 909–920.

86. Varon, A.G.; Nouer, S.A.; Barreiros, G.; Trope, B.M.; Magalhães, F.; Akiti, T.; Garnica, M.; Nucci, M. Superficial Skin Lesions Positive for *Fusarium* Are Associated with Subsequent Development of Invasive Fusariosis. *J. Infect.* **2014**, *68*, 85–89.
87. Pérez-Pérez, L.; Pereiro, M.; Sánchez-Aguilar, D.; Toribio, J. Ulcerous Lesions Disclosing Cutaneous Infection with *Fusarium Solani*. *Acta Derm. Venereol.* **2007**, *87*, 422–424.
88. Battisti, A.S.; Modi, P.; Pangia, J. Sinusitis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023.
89. Gletsou, E.; Ioannou, M.; Liakopoulos, V.; Tsiambas, E.; Ragos, V.; Stefanidis, I. Aspergillosis in Immunocompromised Patients with Haematological Malignancies. *J. BUON Off. J. Balk. Union Oncol.* **2018**, *23*, 7–10.
90. Akhondi, H.; Woldemariam, B.; Rajasurya, V. Fungal Sinusitis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023.
91. Silveira, M.L.C.; Anselmo-Lima, W.T.; Faria, F.M.; Queiroz, D.L.C.; Nogueira, R.L.; Leite, M.G.J.; Lessa, R.M.; Simões, B.P.; Tamashiro, E.; Valera, F.C.P. Impact of Early Detection of Acute Invasive Fungal Rhinosinusitis in Immunocompromised Patients. *BMC Infect. Dis.* **2019**, *19*, 310.
92. Deutsch, P.G.; Whittaker, J.; Prasad, S. Invasive and Non-Invasive Fungal Rhinosinusitis—A Review and Update of the Evidence. *Med. Kaunas Lith.* **2019**, *55*, 319.
93. Shetty, S.; Chandrashekar, S.; Aggarwal, N. A Study on the Prevalence and Clinical Features of Fungal Sinusitis in Chronic Rhinosinusitis. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* **2020**, *72*, 117–122.
94. Suresh, S.; Arumugam, D.; Zacharias, G.; Palaninathan, S.; Vishwanathan, R.; Venkatraman, V. Prevalence and Clinical Profile of Fungal Rhinosinusitis. *Allergy Rhinol.* **2016**, *7*, e115–e120.
95. Rajmane, V.S.; Rajmane, S.T.; Patil, V.C.; Patil, A.B.; Mohite, S.T. Maxillary Rhinosinusitis Due to *Fusarium* Species Leading to Cavernous Sinus Thrombosis. *J. Mycol. Médicale* **2013**, *23*, 53–56.
96. Douglas, A.P.; Chen, S.C.-A.; Slavin, M.A. Emerging Infections Caused by Non-Aspergillus Filamentous Fungi. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2016**, *22*, 670–680.
97. Batista, B.G.; de Chaves, M.A.; Reginatto, P.; Saraiva, O.J.; Fuentefria, A.M. Human Fusariosis: An Emerging Infection That Is Difficult to Treat. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **53**, e20200013.
98. Kim, J.-Y.; Kang, C.-I.; Lee, J.H.; Lee, W.J.; Huh, K.; Cho, S.Y.; Chung, D.R.; Peck, K.R. Clinical Features and Outcomes of Invasive Fusariosis: A Case Series in a Single Center with Literature Review. *Infect. Chemother.* **2021**, *53*, e4.
99. Vadhan, J.D.; Melo, A.J.; Shogan, J.C.; Singh, V.; Carrillo, M. Fast and Fusariosis: A Systematic Review and Case Report of a Rapidly Fatal Central Nervous System Infection. *J. Emerg. Crit. Care Med.* **2022**, *6*.

100. Kremery, V.; Jesenska, Z.; Spanik, S.; Gyarfás, J.; Nogova, J.; Botek, R.; Mardiak, J.; Sufliarsky, J.; Sisolakova, J.; Vanickova, M.; et al. Fungaemia Due to *Fusarium* Spp. in Cancer Patients. *J. Hosp. Infect.* **1997**, *36*, 223–228.
101. Nucci, M.; Anaissie, E.J.; Queiroz-Telles, F.; Martins, C.A.; Trabasso, P.; Solza, C.; Mangini, C.; Simões, B.P.; Colombo, A.L.; Vaz, J.; et al. Outcome Predictors of 84 Patients with Hematologic Malignancies and *Fusarium* Infection. *Cancer* **2003**, *98*, 315–319.
102. Nucci, M.; Marr, K.A.; Vehreschild, M.J.G.T.; de Souza, C.A.; Velasco, E.; Cappellano, P.; Carlesse, F.; Queiroz-Telles, F.; Sheppard, D.C.; Kindo, A.; et al. Improvement in the Outcome of Invasive Fusariosis in the Last Decade. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 580–585.
103. Marr, K.A.; Carter, R.A.; Crippa, F.; Wald, A.; Corey, L. Epidemiology and Outcome of Mould Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2002**, *34*, 909–917.
104. Nucci, M.; Barreiros, G.; Akiti, T.; Anaissie, E.; Nouér, S.A. Invasive Fusariosis in Patients with Hematologic Diseases. *J. Fungi* **2021**, *7*, 815.
105. Girmenia, C.; Arcese, W.; Micozzi, A.; Martino, P.; Bianco, P.; Morace, G. Onychomycosis as a Possible Origin of Disseminated *Fusarium Solani* Infection in a Patient with Severe Aplastic Anemia. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **1992**, *14*, 1167.
106. Jossi, M.; Ambrosioni, J.; Macedo-Vinas, M.; Garbino, J. Invasive Fusariosis with Prolonged Fungemia in a Patient with Acute Lymphoblastic Leukemia: Case Report and Review of the Literature. *Int. J. Infect. Dis. IJID Off. Publ. Int. Soc. Infect. Dis.* **2010**, *14*, e354-356.
107. Dignani, M.C.; Anaissie, E. Human Fusariosis. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *10 Suppl 1*, 67–75.
108. Yu, J.; Chen, Y.; Fang, J.; Zhang, K. Successful Treatment of Disseminated Fusariosis in a Patient with Acute Lymphoblastic Leukemia. *Medicine (Baltimore)* **2019**, *98*, e16246.
109. Nucci, F.; Nouér, S.A.; Capone, D.; Anaissie, E.; Nucci, M. Fusariosis. *Semin. Respir. Crit. Care Med.* **2015**, *36*, 706–714.
110. Nucci, M.; Marr, K.A.; Queiroz-Telles, F.; Martins, C.A.; Trabasso, P.; Costa, S.; Voltarelli, J.C.; Colombo, A.L.; Imhof, A.; Pasquini, R.; et al. *Fusarium* Infection in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2004**, *38*, 1237–1242.
111. Banerji, J.S.; Singh J, C. Cutaneous *Fusarium* Infection in a Renal Transplant Recipient: A Case Report. *J. Med. Case Reports* **2011**, *5*, 205.
112. Montone, K.T. Differentiation of *Fusarium* from *Aspergillus* Species by Colorimetric in Situ Hybridization in Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tissue Sections Using Dual Fluorogenic-Labeled LNA Probes. *Am. J. Clin. Pathol.* **2009**, *132*, 866–870.

113. Jensen, H.E.; Salonen, J.; Ekfors, T.O. The Use of Immunohistochemistry to Improve Sensitivity and Specificity in the Diagnosis of Systemic Mycoses in Patients with Haematological Malignancies. *J. Pathol.* **1997**, *181*, 100–105.
114. Vermeulen, P.; Debourgogne, A. Infections à *Fusarium*. *EMC Mal. Infect.* **2021**.
115. Hennequin, C.; Ranaivoarimalala, C.; Chouaki, T.; Tazerout, M.; Ancelle, T.; Cabaud, J.J.; Raccurt, C.P. Comparison of Aerobic Standard Medium with Specific Fungal Medium for Detecting *Fusarium* Spp in Blood Cultures. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **2002**, *21*, 748–750.
116. Fernández-Cruz, A.; Semiglia, M.A.; Guinea, J.; Martínez-Jiménez, M.D.C.; Escribano, P.; Kwon, M.; Rodríguez-Macías, G.; Chamorro-de-Vega, E.; Rodríguez-González, C.; Navarro, R.; et al. A Retrospective Cohort of Invasive Fusariosis in the Era of Antimould Prophylaxis. *Med. Mycol.* **2020**, *58*, 300–309.
117. Tortorano, A.M.; Esposto, M.C.; Prigitano, A.; Grancini, A.; Ossi, C.; Cavanna, C.; Cascio, G.L. Cross-Reactivity of *Fusarium* Spp. in the Aspergillus Galactomannan Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50*, 1051–1053.
118. Nucci, M.; Carlesse, F.; Cappellano, P.; Varon, A.G.; Seber, A.; Garnica, M.; Nouér, S.A.; Colombo, A.L. Earlier Diagnosis of Invasive Fusariosis with Aspergillus Serum Galactomannan Testing. *PLoS One* **2014**, *9*, e87784.
119. Donnelly, J.P.; Chen, S.C.; Kauffman, C.A.; Steinbach, W.J.; Baddley, J.W.; Verweij, P.E.; Clancy, C.J.; Wingard, J.R.; Lockhart, S.R.; Groll, A.H.; et al. Revision and Update of the Consensus Definitions of Invasive Fungal Disease From the European Organization for Research and Treatment of Cancer and the Mycoses Study Group Education and Research Consortium. *Clin. Infect. Dis.* **2020**, *71*, 1367–1376.
120. Tschopp, J.; Brunel, A.S.; Spertini, O.; Croxatto, A.; Lamothe, F.; Bochud, P.Y. High False-Positive Rate of (1,3)- $\beta$ -D-Glucan in Onco-Hematological Patients Receiving Immunoglobulins and Therapeutic Antibodies. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2022**, *75*, 330–333.
121. Nucci, M.; Barreiros, G.; Reis, H.; Paixão, M.; Akiti, T.; Nouér, S.A. Performance of 1,3-Beta-D-Glucan in the Diagnosis and Monitoring of Invasive Fusariosis. *Mycoses* **2019**, *62*, 570–575.
122. Rimek, D.; Singh, J.; Kappe, R. Cross-Reactivity of the PLATELIA CANDIDA Antigen Detection Enzyme Immunoassay with Fungal Antigen Extracts. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 3395–3398.
123. Alanio, A. La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF en mycologie clinique : avantages réels, écueils potentiels. *J. Anti-Infect.* **2013**, *15*, 71–82.
124. Gravet, A.; Camdessouens-Miehé, G. Application de la spectrométrie de masse à la microbiologie. *Rev. Francoph. Lab.* **2011**, *2011*, 55–64.
125. 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. Medicale* **2019**, *29*, 56–58.

126. Marinach-Patrice, C.; Lethuillier, A.; Marly, A.; Brossas, J.-Y.; Gené, J.; Symoens, F.; Datry, A.; Guarro, J.; Mazier, D.; Hennequin, C. Use of Mass Spectrometry to Identify Clinical *Fusarium* Isolates. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 634–642.
127. Normand, A.C.; Becker, P.; Gabriel, F.; Cassagne, C.; Accoceberry, I.; Gari-Toussaint, M.; Hasseine, L.; De Geyter, D.; Pierard, D.; Surmont, I.; et al. Validation of a New Web Application for Identification of Fungi by Use of Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry. *J. Clin. Microbiol.* **2017**, *55*, 2661–2670.
128. Oechsler, R.A.; Feilmeier, M.R.; Ledee, D.R.; Miller, D.; Diaz, M.R.; Fini, M.E.; Fell, J.W.; Alfonso, E.C. Utility of Molecular Sequence Analysis of the ITS rRNA Region for Identification of *Fusarium* Spp. from Ocular Sources. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **2009**, *50*, 2230–2236.
129. Schoch, C.L.; Seifert, K.A.; Huhndorf, S.; Robert, V.; Spouge, J.L.; Levesque, C.A.; Chen, W.; Fungal Barcoding Consortium; Fungal Barcoding Consortium Author List Nuclear Ribosomal Internal Transcribed Spacer (ITS) Region as a Universal DNA Barcode Marker for Fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2012**, *109*, 6241–6246.
130. O'Donnell, K.; Sutton, D.A.; Rinaldi, M.G.; Sarver, B.A.J.; Balajee, S.A.; Schroers, H.-J.; Summerbell, R.C.; Robert, V.A.R.G.; Crous, P.W.; Zhang, N.; et al. Internet-Accessible DNA Sequence Database for Identifying *Fusaria* from Human and Animal Infections. *J. Clin. Microbiol.* **2010**, *48*, 3708–3718.
131. 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.; et al. Sequence-Based Identification of *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Mucorales* Species in the Clinical Mycology Laboratory: Where Are We and Where Should We Go from Here? *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 877–884.
132. Chandra, N.S.; Wulff, E.G.; Udayashankar, A.C.; Nandini, B.P.; Niranjana, S.R.; Mortensen, C.N.; Prakash, H.S. Prospects of Molecular Markers in *Fusarium* Species Diversity. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2011**, *90*, 1625–1639.
133. Alastruey-Izquierdo, A.; Cuenca-Estrella, M.; Monzón, A.; Mellado, E.; Rodríguez-Tudela, J.L. Antifungal Susceptibility Profile of Clinical *Fusarium* Spp. Isolates Identified by Molecular Methods. *J. Antimicrob. Chemother.* **2008**, *61*, 805–809.
134. O'Donnell, K. Molecular Phylogeny of the *Nectria Haematococca-Fusarium Solani* Species Complex. *Mycologia* **2000**, *92*, 919–938.
135. O'Donnell, K.; Rooney, A.P.; Proctor, R.H.; Brown, D.W.; McCormick, S.P.; Ward, T.J.; Frandsen, R.J.N.; Lysøe, E.; Rehner, S.A.; Aoki, T.; et al. Phylogenetic Analyses of RPB1 and RPB2 Support a Middle Cretaceous Origin for a Clade Comprising All Agriculturally and Medically Important *Fusaria*. *Fungal Genet. Biol. FG B* **2013**, *52*, 20–31.
136. 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**, *82*, 319–323.

137. 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* **2012**, *91*, 65–72.
138. O'Donnell, K.; Sutton, D.A.; Fothergill, A.; McCarthy, D.; Rinaldi, M.G.; Brandt, M.E.; Zhang, N.; Geiser, D.M. Molecular Phylogenetic Diversity, Multilocus Haplotype Nomenclature, and in Vitro Antifungal Resistance within the *Fusarium Solani* Species Complex. *J. Clin. Microbiol.* **2008**, *46*, 2477–2490.
139. Dellière, S.; Guitard, J.; Sabou, M.; Angebault, C.; Moniot, M.; Cornu, M.; Hamane, S.; Bougnoux, M.-E.; Imbert, S.; Pasquier, G.; et al. Detection of Circulating DNA for the Diagnosis of Invasive Fusariosis: Retrospective Analysis of 15 Proven Cases. *Med. Mycol.* **2022**, *60*, myac049.
140. Al-Hatmi, A.M.S.; Curfs-Breuker, I.; de Hoog, G.S.; Meis, J.F.; Verweij, P.E. Antifungal Susceptibility Testing of *Fusarium*: A Practical Approach. *J. Fungi* **2017**, *3*.
141. Ha, Y.; Covert, S.F.; Momany, M. FsFKS1, the 1,3-Beta-Glucan Synthase from the Caspofungin-Resistant Fungus *Fusarium Solani*. *Eukaryot. Cell* **2006**, *5*, 1036–1042.
142. Espinel-Ingroff, A.; Colombo, A.L.; Cordoba, S.; Dufresne, P.J.; Fuller, J.; Ghannoum, M.; Gonzalez, G.M.; Guarro, J.; Kidd, S.E.; Meis, J.F.; et al. 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.* **2016**, *60*, 1079–1084.
143. Astvad, K.M.T.; Arikan-Akdagli, S.; Arendrup, M.C. A Pragmatic Approach to Susceptibility Classification of Yeasts without EUCAST Clinical Breakpoints. *J. Fungi Basel Switz.* **2022**, *8*, 141.
144. Ananda-Rajah, M.R.; Kontoyiannis, D. Isavuconazole: A New Extended Spectrum Triazole for Invasive Mold Diseases. *Future Microbiol.* **2015**, *10*, 693–708.
145. Broutin, A.; Bigot, J.; Senghor, Y.; Moreno-Sabater, A.; Guitard, J.; Hennequin, C. In Vitro Susceptibility of *Fusarium* to Isavuconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2020**, *64*, e01621-19.
146. Badali, H.; Cañete-Gibas, C.; Patterson, H.; Sanders, C.; Mermella, B.; Garcia, V.; Mele, J.; Fan, H.; Wiederhold, N.P. In Vitro Activity of Olorofim against Clinical Isolates of the *Fusarium Oxysporum* and *Fusarium Solani* Species Complexes. *Mycoses* **2021**, *64*, 748–752.
147. Badali, H.; Patterson, H.P.; Sanders, C.J.; Mermella, B.; Gibas, C.F.C.; Ibrahim, A.S.; Shaw, K.J.; Wiederhold, N.P. Manogepix, the Active Moiety of the Investigational Agent Fosmanogepix, Demonstrates In Vitro Activity against Members of the *Fusarium Oxysporum* and *Fusarium Solani* Species Complexes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, e02343-20.
148. Navarro-Rodríguez, P.; Guevara-Suarez, M.; Paredes, K.; Celis, A.; Guarro, J.; Capilla, J. Lack of Correlation of ECV and Outcome in an in Vivo Murine Model of Systemic Fusariosis. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2018**, *92*, 124–126.

149. Nucci, M.; Jenks, J.; Thompson, G.R.; Hoenigl, M.; Dos Santos, M.C.; Forghieri, F.; Rico, J.C.; Bonuomo, V.; López-Soria, L.; Lass-Flörl, C.; et al. Do High MICs Predict the Outcome in Invasive Fusariosis? *J. Antimicrob. Chemother.* **2021**, *76*, 1063–1069.
150. Gupta, A.K.; Mays, R.R.; Versteeg, S.G.; Piraccini, B.M.; Takwale, A.; Shemer, A.; Babaev, M.; Grover, C.; Di Chiacchio, N.G.; Taborda, P.R.O.; et al. Global Perspectives for the Management of Onychomycosis. *Int. J. Dermatol.* **2019**, *58*, 1118–1129.
151. Gupta, A.K.; Versteeg, S.G.; Shear, N.H.; Piguet, V.; Tosti, A.; Piraccini, B.M. A Practical Guide to Curing Onychomycosis: How to Maximize Cure at the Patient, Organism, Treatment, and Environmental Level. *Am. J. Clin. Dermatol.* **2019**, *20*, 123–133.
152. Bueno, J.G.; Martinez, C.; Zapata, B.; Sanclemente, G.; Gallego, M.; Mesa, A.C. In Vitro Activity of Fluconazole, Itraconazole, Voriconazole and Terbinafine against Fungi Causing Onychomycosis. *Clin. Exp. Dermatol.* **2010**, *35*, 658–663.
153. Ghannoum, M.; Isham, N. Fungal Nail Infections (Onychomycosis): A Never-Ending Story? *PLoS Pathog.* **2014**, *10*, e1004105.
154. Bodman, M.A.; Krishnamurthy, K. Onychomycosis. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023.
155. Gupta, A.K.; Gregurek-Novak, T.; Konnikov, N.; Lynde, C.W.; Hofstader, S.; Summerbell, R.C. Itraconazole and Terbinafine Treatment of Some Nondermatophyte Molds Causing Onychomycosis of the Toes and a Review of the Literature. *J. Cutan. Med. Surg.* **2001**, *5*, 206–210.
156. Noguchi, H.; Matsumoto, T.; Kimura, U.; Hiruma, M.; Kano, R.; Yaguchi, T.; Ihn, H. Non-Dermatophyte Mould Onychomycosis in Japan. *Med. Mycol. J.* **2020**, *61*, 23–31.
157. Al-Hatmi, A.M.S.; Bonifaz, A.; Calderón, L.; Curfs-Breuker, I.; Meis, J.F.; van Diepeningen, A.D.; de Hoog, G.S. Proximal Subungual Onychomycosis Caused by *Fusarium Falciforme* Successfully Cured with Posaconazole. *Br. J. Dermatol.* **2015**, *173*, 253–255.
158. Lurati, M.; Baudraz-Rosselet, F.; Vernez, M.; Spring, P.; Bontems, O.; Fratti, M.; Monod, M. Efficacious Treatment of Non-Dermatophyte Mould Onychomycosis with Topical Amphotericin B. *Dermatol. Basel Switz.* **2011**, *223*, 289–292.
159. Dallé da Rosa, P.; Nunes, A.; Borges, R.; Batista, B.; Meneghello Fuentefria, A.; Goldani, L.Z. In Vitro Susceptibility and Multilocus Sequence Typing of *Fusarium* Isolates Causing Keratitis. *J. Mycol. Medicale* **2018**, *28*, 482–485.
160. Azor, M.; Gené, J.; Cano, J.; Guarro, J. Universal in Vitro Antifungal Resistance of Genetic Clades of the *Fusarium Solani* Species Complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1500–1503.
161. Qiu, S.; Zhao, G.-Q.; Lin, J.; Wang, X.; Hu, L.-T.; Du, Z.-D.; Wang, Q.; Zhu, C.-C. Natamycin in the Treatment of Fungal Keratitis: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int. J. Ophthalmol.* **2015**, *8*, 597–602.
162. Oliveira Dos Santos, C.; Kolwijck, E.; van Rooij, J.; Stoutenbeek, R.; Visser, N.; Cheng, Y.Y.; Santana, N.T.Y.; Verweij, P.E.; Eggink, C.A. Epidemiology and Clinical

- Management of Fusarium Keratitis in the Netherlands, 2005-2016. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2020**, *10*, 133.
163. Kawakami, H.; Inuzuka, H.; Hori, N.; Takahashi, N.; Ishida, K.; Mochizuki, K.; Ohkusu, K.; Muraosa, Y.; Watanabe, A.; Kamei, K. Inhibitory Effects of Antimicrobial Agents against Fusarium Species. *Med. Mycol.* **2015**, *53*, 603–611.
164. Oechsler, R.A.; Feilmeier, M.R.; Miller, D.; Shi, W.; Hofling-Lima, A.L.; Alfonso, E.C. Fusarium Keratitis: Genotyping, in Vitro Susceptibility and Clinical Outcomes. *Cornea* **2013**, *32*, 667–673.
165. Aung, T.T.; Chor, W.H.J.; Lynn, M.N.; Chan, A.S.Y.; Tan, D.T.H.; Beuerman, R.W. Rabbit Fungal Keratitis Model of Fusarium Solani Tested Against Three Commercially Available Antifungal Drugs. *Eye Contact Lens* **2020**, *46*, 274–280.
166. Al-Hatmi, A.M.S.; Meletiadiis, J.; Curfs-Breuker, I.; Bonifaz, A.; Meis, J.F.; De Hoog, G.S. In Vitro Combinations of Natamycin with Voriconazole, Itraconazole and Micafungin against Clinical Fusarium Strains Causing Keratitis. *J. Antimicrob. Chemother.* **2016**, *71*, 953–955.
167. Lalitha, P.; Shapiro, B.L.; Loh, A.R.; Fothergill, A.W.; Prajna, N.V.; Srinivasan, M.; Oldenburg, C.E.; Quigley, D.A.; Chidambaram, J.D.; McLeod, S.D.; et al. Amphotericin B and Natamycin Are Not Synergistic in Vitro against Fusarium and Aspergillus Spp. Isolated from Keratitis. *Br. J. Ophthalmol.* **2011**, *95*, 744–745.
168. Sradhanjali, S.; Yein, B.; Sharma, S.; Das, S. In Vitro Synergy of Natamycin and Voriconazole against Clinical Isolates of Fusarium, Candida, Aspergillus and Curvularia Spp. *Br. J. Ophthalmol.* **2018**, *102*, 142–145.
169. He, Y.; Zhou, L.; Gao, C.; Han, L.; Xu, Y. Rifampin Enhances the Activity of Amphotericin B against Fusarium Solani Species Complex and Aspergillus Flavus Species Complex Isolates from Keratitis Patients. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2017**, *61*, e02069-16.
170. Al-Hatmi, A.M.S.; Meis, J.F.; de Hoog, G.S. Fusarium: Molecular Diversity and Intrinsic Drug Resistance. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005464.
171. Nakamura, Y.; Xu, X.; Saito, Y.; Tateishi, T.; Takahashi, T.; Kawachi, Y.; Otsuka, F. Deep Cutaneous Infection by Fusarium Solani in a Healthy Child: Successful Treatment with Local Heat Therapy. *J. Am. Acad. Dermatol.* **2007**, *56*, 873–877.
172. Tortorano, A.M.; Richardson, M.; Roilides, E.; van Diepeningen, A.; Caira, M.; Munoz, P.; Johnson, E.; Meletiadiis, J.; Pana, Z.-D.; Lackner, M.; 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**, *20 Suppl 3*, 27–46.
173. Lortholary, O.; Obenga, G.; Biswas, P.; Caillot, D.; Chachaty, E.; Bienvenu, A.-L.; Cornet, M.; Greene, J.; Herbrecht, R.; Lacroix, C.; et al. International Retrospective Analysis of 73 Cases of Invasive Fusariosis Treated with Voriconazole. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 4446–4450.

- 
174. Campo, M.; Lewis, R.E.; Kontoyiannis, D.P. Invasive Fusariosis in Patients with Hematologic Malignancies at a Cancer Center: 1998-2009. *J. Infect.* **2010**, *60*, 331–337.
175. Jensen, T.G.; Gahrn-Hansen, B.; Arendrup, M.; Bruun, B. Fusarium Fungaemia in Immunocompromised Patients. *Clin. Microbiol. Infect.* **2004**, *10*, 499–501.
176. Rojas, R.; Molina, J.R.; Jarque, I.; Montes, C.; Serrano, J.; Sanz, J.; Besalduch, J.; Carreras, E.; Tomas, J.F.; Madero, L.; et al. Outcome of Antifungal Combination Therapy for Invasive Mold Infections in Hematological Patients Is Independent of the Chosen Combination. *Mediterr. J. Hematol. Infect. Dis.* **2012**, *4*, e2012011.
177. Durand-Joly, I.; Alfandari, S.; Benchikh, Z.; Rodrigue, M.; Espinel-Ingroff, A.; Catteau, B.; Cordevant, C.; Camus, D.; Dei-Cas, E.; Bauters, F.; et al. Successful Outcome of Disseminated Fusarium Infection with Skin Localization Treated with Voriconazole and Amphotericin B-Lipid Complex in a Patient with Acute Leukemia. *J. Clin. Microbiol.* **2003**, *41*, 4898–4900.
178. Guzman-Cottrill, J.A.; Zheng, X.; Chadwick, E.G. Fusarium Solani Endocarditis Successfully Treated with Liposomal Amphotericin B and Voriconazole. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2004**, *23*, 1059–1061.
179. Makowsky, M.J.; Warkentin, D.I.; Savoie, M.L. Caspofungin and Amphotericin B for Disseminated Fusarium Verticillioides in Leukemia. *Ann. Pharmacother.* **2005**, *39*, 1365–1366.
180. Hoenigl, M.; Salmanton-García, J.; Walsh, T.J.; Nucci, M.; Neoh, C.F.; Jenks, J.D.; Lackner, M.; Sprute, R.; Al-Hatmi, A.M.S.; Bassetti, M.; et al. Global Guideline for the Diagnosis and Management of Rare Mould Infections: An Initiative of the European Confederation of Medical Mycology in Cooperation with the International Society for Human and Animal Mycology and the American Society for Microbiology. *Lancet Infect. Dis.* **2021**, *21*, e246–e257.
181. Cornely, O.A.; Mullane, K.M.; Ostrosky-Zeichner, L.; Maher, R.M.; Croos-Dabrera, R.; Lu, Q.; Lademacher, C.; Perfect, J.R.; Oren, I.; Schmitt-Hoffmann, A.-H.; et al. Isavuconazole for Treatment of Rare Invasive Fungal Diseases. *Mycoses* **2018**, *61*, 518–533.
182. Kikuchi, M.; Nakasone, H.; Mitani, K.; Gotoh, M.; Kobayashi, A.; Kurita, N.; Saito, T.; Sato, K.; Kanda, Y.; Japan Hematology and Oncology Clinical Study Group Retrospective Assessment of Secondary Prophylaxis for Invasive Aspergillosis in Neutropenic Hematology Patients and Identification of Risk Factors for Relapse of Fungal Disease. *Scand. J. Infect. Dis.* **2013**, *45*, 531–536.
183. Nucci, M.; Shoham, S.; Abdala, E.; Hamerschlak, N.; Rico, J.C.; Forghieri, F.; Nouér, S.A.; Cappellano, P.; Solza, C.; Gonzaga, Y.; et al. Outcomes of Patients with Invasive Fusariosis Who Undergo Further Immunosuppressive Treatments, Is There a Role for Secondary Prophylaxis? *Mycoses* **2019**, *62*, 413–417.
184. Cowen, L.E.; Sanglard, D.; Howard, S.J.; Rogers, P.D.; Perlin, D.S. Mechanisms of Antifungal Drug Resistance. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2015**, *5*, a019752.

185. Ghannoum, M.A.; Rice, L.B. Antifungal Agents: Mode of Action, Mechanisms of Resistance, and Correlation of These Mechanisms with Bacterial Resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* **1999**, *12*, 501–517.
186. Antonovics, J.; Abbate, J.L.; Baker, C.H.; Daley, D.; Hood, M.E.; Jenkins, C.E.; Johnson, L.J.; Murray, J.J.; Panjeti, V.; Rudolf, V.H.W.; et al. Evolution by Any Other Name: Antibiotic Resistance and Avoidance of the E-Word. *PLoS Biol.* **2007**, *5*, e30.
187. Vallabhaneni, S.; Cleveland, A.A.; Farley, M.M.; Harrison, L.H.; Schaffner, W.; Beldavs, Z.G.; Derado, G.; Pham, C.D.; Lockhart, S.R.; Smith, R.M. Epidemiology and Risk Factors for Echinocandin Nonsusceptible *Candida Glabrata* Bloodstream Infections: Data From a Large Multisite Population-Based Candidemia Surveillance Program, 2008–2014. *Open Forum Infect. Dis.* **2015**, *2*, ofv163.
188. Perlin, D.S.; Rautemaa-Richardson, R.; Alastruey-Izquierdo, A. The Global Problem of Antifungal Resistance: Prevalence, Mechanisms, and Management. *Lancet Infect. Dis.* **2017**, *17*, e383–e392.
189. Pfaller, M.A.; Messer, S.A.; Hollis, R.J.; Boyken, L.; Tendolkar, S.; Kroeger, J.; Diekema, D.J. Variation in Susceptibility of Bloodstream Isolates of *Candida Glabrata* to Fluconazole According to Patient Age and Geographic Location in the United States in 2001 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* **2009**, *47*, 3185–3190.
190. Yamin, D.; Akanmu, M.H.; Al Mutair, A.; Alhumaid, S.; Rabaan, A.A.; Hajissa, K. Global Prevalence of Antifungal-Resistant *Candida Parapsilosis*: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Trop. Med. Infect. Dis.* **2022**, *7*, 188.
191. Verweij, P.E.; Mellado, E.; Melchers, W.J.G. Multiple-Triazole-Resistant Aspergillosis. *N. Engl. J. Med.* **2007**, *356*, 1481–1483.
192. Mayr, A.; Lass-Flörl, C. Epidemiology and Antifungal Resistance in Invasive Aspergillosis According to Primary Disease - Review of the Literature. *Eur. J. Med. Res.* **2011**, *16*, 153.
193. Wiederhold, N.P. Antifungal Resistance: Current Trends and Future Strategies to Combat. *Infect. Drug Resist.* **2017**, *10*, 249–259.
194. Cortez, K.J.; Roilides, E.; Quiroz-Telles, F.; Meletiadis, J.; Antachopoulos, C.; Knudsen, T.; Buchanan, W.; Milanovich, J.; Sutton, D.A.; Fothergill, A.; et al. Infections Caused by *Scedosporium* Spp. *Clin. Microbiol. Rev.* **2008**, *21*, 157–197.
195. Walsh, T.J.; Groll, A.; Hiemenz, J.; Fleming, R.; Roilides, E.; Anaissie, E. Infections Due to Emerging and Uncommon Medically Important Fungal Pathogens. *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2004**, *10 Suppl 1*, 48–66.
196. Brauer, V.S.; Rezende, C.P.; Pessoni, A.M.; De Paula, R.G.; Rangappa, K.S.; Nayaka, S.C.; Gupta, V.K.; Almeida, F. Antifungal Agents in Agriculture: Friends and Foes of Public Health. *Biomolecules* **2019**, *9*, 521.
197. Snelders, E.; Camps, S.M.T.; Karawajczyk, A.; Schaftenaar, G.; Kema, G.H.J.; van der Lee, H.A.; Klaassen, C.H.; Melchers, W.J.G.; Verweij, P.E. Triazole Fungicides Can Induce Cross-Resistance to Medical Triazoles in *Aspergillus Fumigatus*. *PLoS One* **2012**, *7*, e31801.

198. Verweij, P.E.; Chowdhary, A.; Melchers, W.J.G.; Meis, J.F. Azole Resistance in *Aspergillus Fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2016**, *62*, 362–368.
199. Shor, E.; Perlin, D.S. Coping with Stress and the Emergence of Multidrug Resistance in Fungi. *PLoS Pathog.* **2015**, *11*, e1004668.
200. Lamb, D.; Kelly, D.; Kelly, S. Molecular Aspects of Azole Antifungal Action and Resistance. *Drug Resist. Updat.* **1999**, *2*, 390–402.
201. Hu, Z.; He, B.; Ma, L.; Sun, Y.; Niu, Y.; Zeng, B. Recent Advances in Ergosterol Biosynthesis and Regulation Mechanisms in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Indian J. Microbiol.* **2017**, *57*, 270–277.
202. Howard, S.J.; Cerar, D.; Anderson, M.J.; Albarrag, A.; Fisher, M.C.; Pasqualotto, A.C.; Laverdiere, M.; Arendrup, M.C.; Perlin, D.S.; Denning, D.W. Frequency and Evolution of Azole Resistance in *Aspergillus Fumigatus* Associated with Treatment Failure. *Emerg. Infect. Dis.* **2009**, *15*, 1068–1076.
203. Mellado, E.; Garcia-Effron, G.; Alcázar-Fuoli, L.; Melchers, W.J.G.; Verweij, P.E.; Cuenca-Estrella, M.; Rodríguez-Tudela, J.L. A New *Aspergillus Fumigatus* Resistance Mechanism Conferring in Vitro Cross-Resistance to Azole Antifungals Involves a Combination of *cyp51A* Alterations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2007**, *51*, 1897–1904.
204. Howard, S.J.; Arendrup, M.C. Acquired Antifungal Drug Resistance in *Aspergillus Fumigatus*: Epidemiology and Detection. *Med. Mycol.* **2011**, *49 Suppl 1*, S90-95.
205. Becher, R.; Weihmann, F.; Deising, H.B.; Wirsal, S.G. Development of a Novel Multiplex DNA Microarray for *Fusarium Graminearum* and Analysis of Azole Fungicide Responses. *BMC Genomics* **2011**, *12*, 52.
206. Liu, X.; Yu, F.; Schnabel, G.; Wu, J.; Wang, Z.; Ma, Z. Paralogous *Cyp51* Genes in *Fusarium Graminearum* Mediate Differential Sensitivity to Sterol Demethylation Inhibitors. *Fungal Genet. Biol. FG B* **2011**, *48*, 113–123.
207. Fan, J.; Urban, M.; Parker, J.E.; Brewer, H.C.; Kelly, S.L.; Hammond-Kosack, K.E.; Fraaije, B.A.; Liu, X.; Cools, H.J. Characterization of the Sterol 14 $\alpha$ -Demethylases of *Fusarium Graminearum* Identifies a Novel Genus-Specific CYP51 Function. *New Phytol.* **2013**, *198*, 821–835.
208. Revie, N.M.; Iyer, K.R.; Robbins, N.; Cowen, L.E. Antifungal Drug Resistance: Evolution, Mechanisms and Impact. *Curr. Opin. Microbiol.* **2018**, *45*, 70–76.
209. Coleman, J.J.; Mylonakis, E. Efflux in Fungi: La Pièce de Résistance. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000486.
210. Dean, M.; Rzhetsky, A.; Allikmets, R. The Human ATP-Binding Cassette (ABC) Transporter Superfamily. *Genome Res.* **2001**, *11*, 1156–1166.
211. Kovalchuk, A.; Driessen, A.J.M. Phylogenetic Analysis of Fungal ABC Transporters. *BMC Genomics* **2010**, *11*, 177.

212. Lamping, E.; Baret, P.V.; Holmes, A.R.; Monk, B.C.; Goffeau, A.; Cannon, R.D. Fungal PDR Transporters: Phylogeny, Topology, Motifs and Function. *Fungal Genet. Biol. FG B* **2010**, *47*, 127–142.
213. Paumi, C.M.; Chuk, M.; Snider, J.; Stagljar, I.; Michaelis, S. ABC Transporters in *Saccharomyces Cerevisiae* and Their Interactors: New Technology Advances the Biology of the ABCC (MRP) Subfamily. *Microbiol. Mol. Biol. Rev. MMBR* **2009**, *73*, 577–593.
214. Gauthier, C.; Weber, S.; Alarco, A.-M.; Alqawi, O.; Daoud, R.; Georges, E.; Raymond, M. Functional Similarities and Differences between *Candida Albicans* Cdr1p and Cdr2p Transporters. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 1543–1554.
215. Sanglard, D.; Ischer, F.; Parkinson, T.; Falconer, D.; Bille, J. *Candida Albicans* Mutations in the Ergosterol Biosynthetic Pathway and Resistance to Several Antifungal Agents. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2003**, *47*, 2404–2412.
216. Holmes, A.R.; Tsao, S.; Ong, S.-W.; Lamping, E.; Niimi, K.; Monk, B.C.; Niimi, M.; Kaneko, A.; Holland, B.R.; Schmid, J.; et al. Heterozygosity and Functional Allelic Variation in the *Candida Albicans* Efflux Pump Genes CDR1 and CDR2. *Mol. Microbiol.* **2006**, *62*, 170–186.
217. Qi, P.-F.; Zhang, Y.-Z.; Liu, C.-H.; Zhu, J.; Chen, Q.; Guo, Z.-R.; Wang, Y.; Xu, B.-J.; Zheng, T.; Jiang, Y.-F.; 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**, *19*.
218. Li, S.-X.; Song, Y.-J.; Zhang, L.-L.; Shi, J.-P.; Ma, Z.-L.; Guo, H.; Dong, H.-Y.; Li, Y.-M.; Zhang, H. An in Vitro and in Vivo Study on the Synergistic Effect and Mechanism of Itraconazole or Voriconazole Alone and in Combination with Tetrandrine against *Aspergillus Fumigatus*. *J. Med. Microbiol.* **2015**, *64*, 1008–1020.
219. A Cordeiro, R. de; Portela, F.V.; Pereira, L.M.; de Andrade, A.R.; de Sousa, J.K.; Aguiar, A.L.; Pergentino, M.L.; de Sales, G.S.; de Oliveira, J.S.; Medrano, D.J.; et al. Efflux Pump Inhibition Controls Growth and Enhances Antifungal Susceptibility of *Fusarium Solani* Species Complex. *Future Microbiol.* **2020**, *15*, 9–20.
220. James, J.E.; Lamping, E.; Santhanam, J.; Cannon, R.D. PDR Transporter ABC1 Is Involved in the Innate Azole Resistance of the Human Fungal Pathogen *Fusarium Keratoplasticum*. *Front. Microbiol.* **2021**, *12*, 673206.
221. Guo, H.; Xie, S.M.; Li, S.X.; Song, Y.J.; Zhong, X.Y.; Zhang, H. Involvement of Mitochondrial Aerobic Respiratory Activity in Efflux-Mediated Resistance of *C. Albicans* to Fluconazole. *J. Mycol. Medicale* **2017**, *27*, 339–344.
222. Morschhäuser, J.; Barker, K.S.; Liu, T.T.; BlaB-Warmuth, J.; Homayouni, R.; Rogers, P.D. The Transcription Factor Mrr1p Controls Expression of the MDR1 Efflux Pump and Mediates Multidrug Resistance in *Candida Albicans*. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, e164.
223. Verweij, P.E.; Zhang, J.; Debets, A.J.M.; Meis, J.F.; van de Veerdonk, F.L.; Schoustra, S.E.; Zwaan, B.J.; Melchers, W.J.G. In-Host Adaptation and Acquired Triazole Resistance in *Aspergillus Fumigatus*: A Dilemma for Clinical Management. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, e251–e260.

- 
224. Stevenson, E.M.; Gaze, W.H.; Gow, N.A.R.; Hart, A.; Schmidt, W.; Usher, J.; Warris, A.; Wilkinson, H.; Murray, A.K. Antifungal Exposure and Resistance Development: Defining Minimal Selective Antifungal Concentrations and Testing Methodologies. *Front. Fungal Biol.* **2022**, *3*.
225. Ferrari, S.; Sanguinetti, M.; De Bernardis, F.; Torelli, R.; Posteraro, B.; Vandeputte, P.; Sanglard, D. Loss of Mitochondrial Functions Associated with Azole Resistance in *Candida Glabrata* Results in Enhanced Virulence in Mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2011**, *55*, 1852–1860.
226. Ferrari, S.; Ischer, F.; Calabrese, D.; Posteraro, B.; Sanguinetti, M.; Fadda, G.; Rohde, B.; Bauser, C.; Bader, O.; Sanglard, D. Gain of Function Mutations in CgPDR1 of *Candida Glabrata* Not Only Mediate Antifungal Resistance but Also Enhance Virulence. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*, e1000268.
227. Cowen, L.E.; Kohn, L.M.; Anderson, J.B. Divergence in Fitness and Evolution of Drug Resistance in Experimental Populations of *Candida Albicans*. *J. Bacteriol.* **2001**, *183*, 2971–2978.
228. Ben-Ami, R.; Garcia-Effron, G.; Lewis, R.E.; Gamarra, S.; Leventakos, K.; Perlin, D.S.; Kontoyiannis, D.P. Fitness and Virulence Costs of *Candida Albicans* FKS1 Hot Spot Mutations Associated with Echinocandin Resistance. *J. Infect. Dis.* **2011**, *204*, 626–635.
229. Valsecchi, I.; Mellado, E.; Beau, R.; Raj, S.; Latgé, J.-P. Fitness Studies of Azole-Resistant Strains of *Aspergillus Fumigatus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 7866–7869.
230. Salzet, M. Vertebrate Innate Immunity Resembles a Mosaic of Invertebrate Immune Responses. *Trends Immunol.* **2001**, *22*, 285–288.
231. Durieux, M.-F.; Melloul, É.; Jemel, S.; Roisin, L.; Dardé, M.-L.; Guillot, J.; Dannaoui, É.; Botterel, F. *Galleria Mellonella* as a Screening Tool to Study Virulence Factors of *Aspergillus Fumigatus*. *Virulence* **2021**, *12*, 818–834.
232. Jemel, S.; Guillot, J.; Kallel, K.; Jouvion, G.; Brisebard, E.; Billaud, E.; Jullien, V.; Botterel, F.; Dannaoui, E. In Vivo Efficacy of Voriconazole in a *Galleria Mellonella* Model of Invasive Infection Due to Azole-Susceptible or Resistant *Aspergillus Fumigatus* Isolates. *J. Fungi Basel Switz.* **2021**, *7*, 1012.
233. Maurer, E.; Browne, N.; Surlis, C.; Jukic, E.; Moser, P.; Kavanagh, K.; Lass-Flörl, C.; Binder, U. *Galleria Mellonella* as a Host Model to Study *Aspergillus Terreus* Virulence and Amphotericin B Resistance. *Virulence* **2015**, *6*, 591–598.
234. Herkert, P.F.; Al-Hatmi, A.M.S.; de Oliveira Salvador, G.L.; Muro, M.D.; Pinheiro, R.L.; Nucci, M.; Queiroz-Telles, F.; de Hoog, G.S.; Meis, J.F. Molecular Characterization and Antifungal Susceptibility of Clinical *Fusarium* Species From Brazil. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 737.
235. Tortorano, A.M.; Prigitano, A.; Esposto, M.C.; Arsic Arsenijevic, V.; Kolarovic, J.; Ivanovic, D.; Paripovic, L.; Klingspor, L.; Nordøy, I.; Hamal, P.; et al. European Confederation of Medical Mycology (ECMM) Epidemiological Survey on Invasive Infections Due to *Fusarium* Species in Europe. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* **2014**, *33*, 1623–1630.

236. Blaize, M.; Normand, A.-C.; Imbert, S.; Al-Hatmi, A.M.S.; Chryssanthou, E.; Cassaing, S.; Schuttler, C.; Hasseine, L.; Mahinc, C.; Costa, D.; et al. Antifungal Susceptibility of 182 *Fusarium* Species Isolates from 20 European Centers: Comparison between EUCAST and Gradient Concentration Strip Methods. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2021**, *65*, 10.1128/aac.01495-21.
237. 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**, *31*, 615–618.
238. Clinical and Laboratory Standards Institute *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi*; 2017;
239. Lalitha, P.; Shapiro, B.L.; Srinivasan, M.; Prajna, N.V.; Acharya, N.R.; Fothergill, A.W.; Ruiz, J.; Chidambaram, J.D.; Maxey, K.J.; Hong, K.C.; et al. Antimicrobial Susceptibility of *Fusarium*, *Aspergillus*, and Other Filamentous Fungi Isolated From Keratitis. *Arch. Ophthalmol.* **2007**, *125*, 789–793.
240. Jørgensen, K.M.; Astvad, K.M.T.; Hare, R.K.; Arendrup, M.C. EUCAST Susceptibility Testing of Isavuconazole: MIC Data for Contemporary Clinical Mold and Yeast Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2019**, *63*.
241. Chen, Y.; Zhou, M.-G. Characterization of *Fusarium Graminearum* Isolates Resistant to Both Carbendazim and a New Fungicide JS399-19. *Phytopathology* **2009**, *99*, 441–446.
242. Gomez-Lopez, A.; Forastiero, A.; Cendejas-Bueno, E.; Gregson, L.; Mellado, E.; Howard, S.J.; Livermore, J.L.; Hope, W.W.; Cuenca-Estrella, M. An Invertebrate Model to Evaluate Virulence in *Aspergillus Fumigatus*: The Role of Azole Resistance. *Med. Mycol.* **2014**, *52*, 311–319.
243. Aufauvre-Brown, A.; Brown, J.S.; Holden, D.W. Comparison of Virulence between Clinical and Environmental Isolates of *Aspergillus Fumigatus*. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **1998**, *17*, 778–780.
244. Kavanagh, K.; Sheehan, G. The Use of *Galleria Mellonella* Larvae to Identify Novel Antimicrobial Agents against Fungal Species of Medical Interest. *J. Fungi* **2018**, *4*, 113.
245. Treviño-Rangel, R. de J.; Villanueva-Lozano, H.; Méndez-Galomo, K.S.; Solís-Villegas, E.M.; Becerril-García, M.A.; Montoya, A.M.; Robledo-Leal, E.R.; González, G.M. In Vivo Evaluation of the Antifungal Activity of Sertraline against *Aspergillus Fumigatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2019**, *74*, 663–666.
246. Forastiero, A.; Bernal-Martínez, L.; Mellado, E.; Cendejas, E.; Gomez-Lopez, A. In Vivo Efficacy of Voriconazole and Posaconazole Therapy in a Novel Invertebrate Model of *Aspergillus Fumigatus* Infection. *Int. J. Antimicrob. Agents* **2015**, *46*, 511–517.
247. Garcia-Rubio, R.; Alcazar-Fuoli, L.; Monteiro, M.C.; Monzon, S.; Cuesta, I.; Pelaez, T.; Mellado, E. Insight into the Significance of *Aspergillus Fumigatus* cyp51A Polymorphisms. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e00241-18.

- 
248. Navarro-Velasco, G.Y.; Prados-Rosales, R.C.; Ortíz-Urquiza, A.; Quesada-Moraga, E.; Di Pietro, A. *Galleria Mellonella* as Model Host for the Trans-Kingdom Pathogen *Fusarium Oxysporum*. *Fungal Genet. Biol. FG B* **2011**, *48*, 1124–1129.
249. James, J.E.; Lamping, E.; Santhanam, J.; Milne, T.J.; Abd Razak, M.F.; Zakaria, L.; Cannon, R.D. A 23 Bp *cyp51A* Promoter Deletion Associated With Voriconazole Resistance in Clinical and Environmental Isolates of *Neocosmospora Keratoplastica*. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*, 272.
250. Altschul, S.F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E.W.; Lipman, D.J. Basic Local Alignment Search Tool. *J. Mol. Biol.* **1990**, *215*, 403–410.
251. Liu, W.; Sun, Y.; Chen, W.; Liu, W.; Wan, Z.; Bu, D.; Li, R. The T788G Mutation in the *cyp51C* Gene Confers Voriconazole Resistance in *Aspergillus Flavus* Causing Aspergillosis. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 2598–2603.
252. Lucio, J.; Gonzalez-Jimenez, I.; Rivero-Menendez, O.; Alastruey-Izquierdo, A.; Pelaez, T.; Alcazar-Fuoli, L.; Mellado, E. Point Mutations in the 14- $\alpha$  Sterol Demethylase *Cyp51A* or *Cyp51C* Could Contribute to Azole Resistance in *Aspergillus Flavus*. *Genes* **2020**, *11*, 1217.
253. Paul, R.A.; Rudramurthy, S.M.; Meis, J.F.; Mouton, J.W.; Chakrabarti, A. A Novel Y319H Substitution in *CYP51C* Associated with Azole Resistance in *Aspergillus Flavus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2015**, *59*, 6615–6619.
254. Yang, J.; Zhang, Y. I-TASSER Server: New Development for Protein Structure and Function Predictions. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43*, W174–181.
255. Zhang, C.; Freddolino, P.L.; Zhang, Y. COFACTOR: Improved Protein Function Prediction by Combining Structure, Sequence and Protein-Protein Interaction Information. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45*, W291–W299.
256. Guinea, J. Updated EUCAST Clinical Breakpoints against *Aspergillus*, Implications for the Clinical Microbiology Laboratory. *J. Fungi Basel Switz.* **2020**, *6*.
257. Berntson, G.G.; Cacioppo, J.T. Reductionism. In *Paradigms in Theory Construction*; L'Abate, L., Ed.; Springer: New York, NY, 2012; pp. 365–374.
258. Mortensen, K.L.; Jensen, R.H.; Johansen, H.K.; Skov, M.; Pressler, T.; Howard, S.J.; Leatherbarrow, H.; Mellado, E.; Arendrup, M.C. *Aspergillus* Species and Other Molds in Respiratory Samples from Patients with Cystic Fibrosis: A Laboratory-Based Study with Focus on *Aspergillus Fumigatus* Azole Resistance. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49*, 2243–2251.
259. Alcazar-Fuoli, L.; Mellado, E.; Cuenca-Estrella, M.; Sanglard, D. Probing the Role of Point Mutations in the *cyp51A* Gene from *Aspergillus Fumigatus* in the Model Yeast *Saccharomyces Cerevisiae*. *Med. Mycol.* **2011**, *49*, 276–284.
260. Snelders, E.; Karawajczyk, A.; Schaftenaar, G.; Verweij, P.E.; Melchers, W.J.G. Azole Resistance Profile of Amino Acid Changes in *Aspergillus Fumigatus* *CYP51A* Based on Protein Homology Modeling. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2010**, *54*, 2425–2430.

261. Gonzalez-Jimenez, I.; Lucio, J.; Amich, J.; Cuesta, I.; Sanchez Arroyo, R.; Alcazar-Fuoli, L.; Mellado, E. A Cyp51B Mutation Contributes to Azole Resistance in *Aspergillus Fumigatus*. *J. Fungi Basel Switz.* **2020**, *6*.
262. da Silva Ferreira, M.E.; Capellaro, J.L.; dos Reis Marques, E.; Malavazi, I.; Perlin, D.; Park, S.; Anderson, J.B.; Colombo, A.L.; Arthington-Skaggs, B.A.; Goldman, M.H.S.; et al. In Vitro Evolution of Itraconazole Resistance in *Aspergillus Fumigatus* Involves Multiple Mechanisms of Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 4405–4413.
263. Van Rhijn, N.; Bromley, M.; Richardson, M.; Bowyer, P. CYP51 Parologue Structure Is Associated with Intrinsic Azole Resistance in Fungi. *mBio* **2021**, *12*, e0194521.
264. Zheng, B.; Yan, L.; Liang, W.; Yang, Q. Paralogous Cyp51s Mediate the Differential Sensitivity of *Fusarium Oxysporum* to Sterol Demethylation Inhibitors. *Pest Manag. Sci.* **2019**, *75*, 396–404.
265. Fan, J.; Chen, F.; Diao, Y.; Cools, H.J.; Kelly, S.L.; Liu, X. The Y123H Substitution Perturbs FvCYP51B Function and Confers Prochloraz Resistance in Laboratory Mutants of *Fusarium Verticillioides*. *Plant Pathol.* **2014**, *63*, 952–960.
266. Zhao, Y.; Chi, M.; Sun, H.; Qian, H.; Yang, J.; Huang, J. The FgCYP51B Y123H Mutation Confers Reduced Sensitivity to Prochloraz and Is Important for Conidiation and Ascospore Development in *Fusarium Graminearum*. *Phytopathology* **2021**.
267. D'Agostino, M.; Lemmet, T.; Dufay, C.; Luc, A.; Fripiat, J.P.; 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. Larchmt. N* **2018**, *24*, 768–773.
268. Wang, R.-Y.; Gao, B.; Li, X.-H.; Ma, J.; Chen, S.-L. First Report of *Fusarium Solani* Causing *Fusarium* Root Rot and Stem Canker on Storage Roots of Sweet Potato in China. *Plant Dis.* **2014**, *98*, 160.
269. Misiewicz, A.; Goncerzewicz, A.; Jędrzejczak, R.; Zdziennicki, F. Intra-Strains Diversity of Expression of Polymorphic PKS4 Gene in Comparison in Zearalenone Production by *Fusarium Graminearum* during in Vitro Cultivation. *Acta Biochim. Pol.* **2016**, *63*, 97–102.
270. White, T.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. White, T. J., T. D. Bruns, S. B. Lee, and J. W. Taylor. Amplification and Direct Sequencing of Fungal Ribosomal RNA Genes for Phylogenetics. In: 1990; pp. 315–322.
271. Andersen, C.L.; Jensen, J.L.; Ørntoft, T.F. Normalization of Real-Time Quantitative Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* **2004**, *64*, 5245–5250.
272. Livak, K.J.; Schmittgen, T.D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods San Diego Calif* **2001**, *25*, 402–408.

273. Kanafani, Z.A.; Perfect, J.R. Antimicrobial Resistance: Resistance to Antifungal Agents: Mechanisms and Clinical Impact. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* **2008**, *46*, 120–128.
274. Holmes, A.R.; Lin, Y.-H.; Niimi, K.; Lamping, E.; Keniya, M.; Niimi, M.; Tanabe, K.; Monk, B.C.; Cannon, R.D. ABC Transporter Cdr1p Contributes More than Cdr2p Does to Fluconazole Efflux in Fluconazole-Resistant *Candida Albicans* Clinical Isolates. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2008**, *52*, 3851–3862.
275. Tsao, S.; Rahkhoodaee, F.; Raymond, M. Relative Contributions of the *Candida Albicans* ABC Transporters Cdr1p and Cdr2p to Clinical Azole Resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2009**, *53*, 1344–1352.
276. Fraczek, M.G.; Bromley, M.; Buied, A.; Moore, C.B.; Rajendran, R.; Rautemaa, R.; Ramage, G.; Denning, D.W.; Bowyer, P. The cdr1B Efflux Transporter Is Associated with Non-Cyp51a-Mediated Itraconazole Resistance in *Aspergillus Fumigatus*. *J. Antimicrob. Chemother.* **2013**, *68*, 1486–1496.
277. Moazeni, M.; Aslani, N.; Nabili, M.; Badali, H. Overexpression of Efflux Pump Genes Is an Alternative Mechanism in Voriconazole Resistant *Aspergillus Fumigatus* Isolates Without Relative Mutations in CYP5A. *Infect. Disord. Drug Targets* **2020**, *20*, 860–866.
278. Natesan, S.K.; Lamichchane, A.K.; Swaminathan, S.; Wu, W. Differential Expression of ATP-Binding Cassette and/or Major Facilitator Superfamily Class Efflux Pumps Contributes to Voriconazole Resistance in *Aspergillus Flavus*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **2013**, *76*, 458–463.
279. Paul, R.A.; Rudramurthy, S.M.; Dhaliwal, M.; Singh, P.; Ghosh, A.K.; Kaur, H.; Varma, S.; Agarwal, R.; Chakrabarti, A. Magnitude of Voriconazole Resistance in Clinical and Environmental Isolates of *Aspergillus Flavus* and Investigation into the Role of Multidrug Efflux Pumps. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2018**, *62*, e01022-18.
280. Coleman, J.J.; White, G.J.; Rodriguez-Carres, M.; Vanetten, H.D. An ABC Transporter and a Cytochrome P450 of *Nectria Haematococca* MPVI Are Virulence Factors on Pea and Are the Major Tolerance Mechanisms to the Phytoalexin Pisatin. *Mol. Plant-Microbe Interact. MPMI* **2011**, *24*, 368–376.
281. D’agostino, M.; Tesse, N.; Lavergne, R.A.; Le Pape, P.; Frippiat, J.P.; Machouart, M.; Debourgogne, A. In Vitro Antifungal Effect of a Plant-Based Product, CIN-102, on Antifungal Resistant Filamentous Fungi and Their Biofilms. *J. Med. Microbiol.* **2021**, *70*, 001399.
282. Escribano, P.; Recio, S.; Peláez, T.; González-Rivera, M.; Bouza, E.; Guinea, J. In Vitro Acquisition of Secondary Azole Resistance in *Aspergillus Fumigatus* Isolates after Prolonged Exposure to Itraconazole: Presence of Heteroresistant Populations. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2012**, *56*, 174–178.
283. Pinto e Silva, A.T.; Costa-de-Oliveira, S.; Silva-Dias, A.; Pina-Vaz, C.; Rodrigues, A.G. Dynamics of in Vitro Acquisition of Resistance by *Candida Parapsilosis* to Different Azoles. *FEMS Yeast Res.* **2009**, *9*, 626–633.

284. Händel, N.; de la Sayette, S.; Verweij, P.E.; Brul, S.; ter Kuile, B.H. De Novo Induction of Resistance against Voriconazole in *Aspergillus Fumigatus*. *J. Glob. Antimicrob. Resist.* **2015**, *3*, 52–53.
285. Chen, P.; Liu, M.; Zeng, Q.; Zhang, Z.; Liu, W.; Sang, H.; Lu, L. Uncovering New Mutations Conferring Azole Resistance in the *Aspergillus Fumigatus* cyp51A Gene. *Front. Microbiol.* **2020**, *10*, 3127.
286. Dheda, K.; Huggett, J.F.; Bustin, S.A.; Johnson, M.A.; Rook, G.; Zumla, A. Validation of Housekeeping Genes for Normalizing RNA Expression in Real-Time PCR. *BioTechniques* **2004**, *37*, 112–114, 116, 118–119.
287. Vandesompele, J.; De Preter, K.; Pattyn, F.; Poppe, B.; Van Roy, N.; De Paepe, A.; Speleman, F. Accurate Normalization of Real-Time Quantitative RT-PCR Data by Geometric Averaging of Multiple Internal Control Genes. *Genome Biol.* **2002**, *3*, RESEARCH0034.
288. Sihem, B.; Ben Ali, S.; Mohamed, M.; Guasmi, F.; Boussora, F.; Radhouani, F.; Faghim, J.; Gasmi, A.; Triki, T.; Lahzein, M.; et al. Validation Des Gènes de Référence Au Cours de La Maturation Chez l'olivier (*Olea Europaea* L.). *Rev. Régions Arid.* **2018**, *43*, 7–14.
289. Huang, X.; Sun, M.; Lu, X.; Li, S. Serial Passage through Resistant and Susceptible Cucumber Cultivars Affects the Virulence of *Fusarium Oxysporum* f. Sp. *Cucumerinum*. *MicrobiologyOpen* **2019**, *8*, e00641.
290. Li, N.; Zhao, J.; Zhang, R.; Deng, L.; Li, J.; Gao, Y.; Liu, C. Effect of Tebuconazole Enantiomers and Environmental Factors on Fumonisin Accumulation and FUM Gene Expression in *Fusarium Verticillioides*. *J. Agric. Food Chem.* **2018**, *66*, 13107–13115.
291. Akosah, Y.A.; Kostennikova, Z.S.; Lutfullin, M.T.; Lutfullina, G.F.; Afordoanyi, D.M.; Vologin, S.G.; Mardanova, A.M. Induced Expression of CYP51a and HK1 Genes Associated with Penconazole and Fludioxonil Resistance in the Potato Pathogen *Fusarium Oxysporum*. *Microorganisms* **2023**, *11*, 1257.
292. Lelièvre, L.; Groh, M.; Angebault, C.; Maherault, A.-C.; Didier, E.; Bougnoux, M.-E. Azole Resistant *Aspergillus Fumigatus*: An Emerging Problem. *Médecine Mal. Infect.* **2013**, *43*, 139–145.
293. Berger, S.; El Chazli, Y.; Babu, A.F.; Coste, A.T. Azole Resistance in *Aspergillus Fumigatus*: A Consequence of Antifungal Use in Agriculture? *Front. Microbiol.* **2017**, *8*.



# **Etude des mécanismes de résistance aux azolés chez le complexe d'espèces *Fusarium solani***

## **Mechanisms of resistance to azole antifungals in *Fusarium solani* species complex**

Pierre VERMEULEN

Les membres du complexe d'espèces *Fusarium solani* (FSSC) sont des champignons filamenteux phytopathogènes cosmopolites et naturellement présents dans le sol, l'air et l'eau. Ils sont responsables d'atteintes superficielles, mais peuvent aussi entraîner des infections fongiques invasives sévères chez les patients immunodéficients. Le traitement de référence des fusarioses est le voriconazole. Malgré ces recommandations, certaines souches présentent une sensibilité diminuée au voriconazole. La résistance aux azolés implique de multiples mécanismes : (i) modifications de la cible ; (ii) efflux et imperméabilité ; (iii) adaptation cellulaire. L'objectif du projet RAFU (Résistance aux Azolés chez *Fusarium*) est d'étudier la virulence *in vivo* du champignon ainsi que les différents mécanismes de la résistance aux azolés. Grâce au modèle *in vivo* *Galleria mellonella*, une tendance au « fitness cost » entre virulence et résistance aux antifongiques azolés a été observée entre les souches, bien que le traitement par voriconazole ne montre aucun bénéfice, quel que soit le profil de sensibilité. L'étude des mécanismes de résistance a permis d'émettre l'hypothèse que la faible sensibilité naturelle du genre *Fusarium* serait due à une modification de la cible, impliquant une difficulté d'accès plus grande des antifongiques azolés au site actif de la 14 alpha déméthylase. De plus, un mécanisme d'efflux du voriconazole touchant les souches présentant les CMI les plus fortes expliquerait les variabilités de sensibilité. Ces résultats ont également permis d'élaborer de nouvelles orientations pour de futures études, afin de mieux appréhender la prise en charge complexe des infections fongiques à *Fusarium solani*.

**Mots clés :** *Fusarium solani*, Virulence, Résistance, Voriconazole, *Galleria mellonella*,

Members of the *Fusarium solani* species complex (FSSC) are ubiquitous filamentous fungi present in soil, air and water. They are responsible for superficial infections, but can also cause severe invasive fungal infections in immunodeficient patients. The standard treatment for fusariosis is voriconazole. Despite these recommendations, some strains are less sensitive to voriconazole. Azole resistance involves multiple mechanisms: (i) target modification; (ii) efflux and impermeability; (iii) cellular adaptation. The aim of the RAFU project (Azole Resistance in *Fusarium*) is to study the virulence of the fungus *in vivo* and the various mechanisms involved in azole resistance. With the *Galleria mellonella in vivo* model, a trend towards 'fitness cost' between virulence and resistance to antifungals could be observed between strains, although treatment with voriconazole showed no benefit, whatever the sensitivity profile. The study of resistance mechanisms has led to the hypothesis that the low natural susceptibility of the *Fusarium* genus is due to a modification of the target, involving greater difficulty for azole antifungals to access the active site of 14 alpha demethylase. In addition, a voriconazole efflux mechanism affecting the strains with the highest MICs would explain the variability in sensitivity. These results have also provided new guidelines for future studies, to better understand the complex management of *Fusarium solani* fungal infections.

**Key words:** *Fusarium solani*, Virulence, Resistance, Voriconazole, *Galleria mellonella*,