



**HAL**  
open science

# Distribution dans la mucoviscidose et écologie des différentes espèces du complexe *Scedosporium* *apiospermum*

Amandine Rougeron

► **To cite this version:**

Amandine Rougeron. Distribution dans la mucoviscidose et écologie des différentes espèces du complexe *Scedosporium apiospermum*. Parasitologie. Université d'Angers, 2013. Français. NNT: . tel-00966210

**HAL Id: tel-00966210**

**<https://theses.hal.science/tel-00966210>**

Submitted on 26 Mar 2014

**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.

# Thèse de Doctorat

**Amandine ROUGERON**

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du  
grade de Docteur de l'Université d'Angers  
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : Biologie - Santé

Discipline : Microbiologie

Spécialité : Parasitologie - Mycologie

Unité de recherche : Groupe d'Etude des Interactions Hôte - Pathogène (GEIHP), UPRES-EA 3142

Soutenue le 28 novembre 2013

Thèse N° : 1389

## **Distribution dans la mucoviscidose et écologie des différentes espèces du complexe *Scedosporium apiospermum***

### **JURY**

Rapporteurs : **Stéphane BRETAGNE**, Professeur d'Université - Praticien Hospitalier, Université Paris - Est Créteil  
**Loïc FAVENNEC**, Professeur d'Université - Praticien Hospitalier, Université de Rouen

Examineurs : **Valérie LIVRELLI**, Professeur d'Université, Université d'Auvergne  
**Dominique CHABASSE**, Professeur d'Université - Praticien Hospitalier, Université d'Angers

Directeur de Thèse : **Jean-Philippe BOUCHARA**, Professeur d'Université - Praticien Hospitalier, Université d'Angers

Co-encadrant de Thèse : **Sandrine GIRAUD**, Maître de conférences, Université d'Angers

*« Devant, le soleil enflamme les dernières braises du ciel.  
Le jour se meurt, tandis qu'un autre se prépare déjà,  
derrière, plus fort encore. La Nature nous l'enseigne  
chaque jour, il faut faire le deuil des choses passées, parce  
que ce qui pointe devant brille d'une beauté sans cesse  
renouvelée. » [Franck Thilliez, Deuils de miel]*

## REMERCIEMENTS

*Je tiens à remercier très sincèrement **Monsieur le Professeur Stéphane Bretagne** et **Monsieur le Professeur Loïc Favennec** d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'avoir consacré du temps à la lecture, l'analyse et la critique de ce mémoire.*

*Je remercie tout particulièrement **Monsieur le Professeur Dominique Chabasse** d'avoir accepté d'être le président du jury de cette thèse. J'ai conscience de ce que vous avez fait pour d'une part être présent le jour de ma soutenance, et pour d'autre part avoir rendu ce projet possible. Je vous en serai toujours reconnaissante.*

*Je tiens à remercier **Madame le Professeur Valérie Livrelli** d'avoir accepté d'être examinateur de ce travail. Cela me tenait à cœur de partager ce travail avec vous, puisque, je me dois de le souligner ici, vous êtes à l'origine de mon parcours. C'est en effet grâce à vos précieux conseils que j'ai choisi de m'orienter vers le cursus recherche, et grâce à vous que j'ai eu l'occasion d'aller aux Etats-Unis pour mon stage de Master 1. J'espère être à la hauteur pour l'année à venir que nous allons partager.*

*Je remercie très sincèrement **Monsieur le Professeur Jean-Philippe Bouchara** d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. J'ai conscience de tout ce que vous avez fait pour que je puisse réaliser ce travail de thèse au sein de votre laboratoire. Je ne vous remercierais jamais assez de tout ce que vous m'avez apporté, et je vous exprime ici toute ma reconnaissance.*

*Je tiens à remercier profondément **Madame le Docteur Sandrine Giraud** d'avoir co-encadré ce travail. Pour ta disponibilité sans failles, que ce soit pour les manip', les crises de larmes, les fous-rire, et ta gentillesse. Je n'en serais certainement pas là aujourd'hui si tu n'avais pas été là... Une écoute attentive, de précieux conseils, exprimés quelquefois avec fermeté pour endiguer mon mauvais caractère, cette expérience de thèse restera à jamais gravée dans ma mémoire. Je tiens également à te rassurer, étant ta première doctorante, tu es excellente dans cet exercice !*

*Je tiens également à remercier **Monsieur le Professeur Raymond Robert**, pour les précieux conseils que vous avez su me prodiguer pour l'avancement de ma carrière, j'espère que mon travail portera ses fruits...*

Je remercie tous les **membres du Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène**.

**Julia, Gaëlle, Charlotte**, merci pour les moments conviviaux que nous avons pu partager, et le travail de l'ombre que vous réalisez sans forcément obtenir de retour... je vous souhaite le meilleur pour les années à venir !

**Agnès, Maxime**, merci de m'avoir supporté pendant ces deux années de rédaction (et oui !) pendant lesquelles je n'ai pas toujours été bien lunée...bon courage à vous pour la suite de vos travaux.

**Monsieur le Docteur Patrick Vandeputte**, merci pour cette excellente année que nous avons partagée. Nos fous-rire à en pleurer resteront de très bons souvenirs. J'ai énormément appris à tes côtés, même si je ne t'arriverai jamais à la cheville (lol !). Je te souhaite beaucoup de courage pour la suite, et croise les doigts très fort pour que les choses se décantent cette année pour toi ! Tu le mérites, n'en doutes pas !

**Tram, Sarah, Sara**, j'ai été honorée de faire votre connaissance, vous êtes des filles sérieuses fort sympathiques, ce fût un plaisir de travailler avec vous.

Je souhaite remercier le personnel du laboratoire hospitalier de Parasitologie - Mycologie du CHU d'Angers de s'être toujours montré disponible à mon égard,

**Monsieur le Docteur Bernard Cimon**, merci de m'avoir fait confiance en m'offrant la possibilité d'enseigner pendant ma dernière année de thèse. Ce fût des moments très agréables, qui m'ont conforté dans l'idée de devenir enseignant. Merci beaucoup !

**Claire, Maud, Chantal**, merci pour l'écoute attentive dont vous avez fait preuve au cours de ce travail de thèse, je garderai d'excellents souvenirs de nos discussions, vous êtes vraiment des personnes exceptionnelles !

Je tiens à remercier les **nombreux stagiaires que j'ai exploités** pour réaliser ce travail de thèse, et sans qui rien n'aurait été possible. Je pense en particulier à ceux rattachés à l'ISSBA, **Pauline** (ma première stagiaire !) et **Rabbi** (l'insouciant) ; ceux de BTS, **Richard** (sans qui je n'aurais jamais été prête pour mon séjour aux Pays-Bas) et **Paul** (qui a pu venir faire deux stages au GEIHP grâce au gâteau marbré de sa mamie !) ; à aux étudiants en médecine en stage de Master 1 qui ont su faire taire les médisants (!! ) **Yasmin, Adeline, N'Guyen, Maxime, Lucie, Valentine, Magalie, Agnès, Clarisse** et **Céline**.

Je remercie les personnes avec qui j'ai eu l'honneur de travailler dans le cadre de collaborations.

**David Landry**, merci d'avoir toujours été disponible, même si j'ai dû mettre tes nerfs à rude épreuve certaines fois (sonde du pHmètre, retard pour rendre les tamis,...), je me souviendrai toujours de l'après-midi que tu m'as consacré pour aller faire des prélèvements de sol dans des parcelles de vignes à Saint-Jean-des-Mauvrets !!

**Marie-Elisabeth Bougnoux, Julie** et **Jean-Luc**, merci pour l'initiation à la technologie MALDI-TOF/MS, je me souviendrai longtemps de cette escapade parisienne, la semaine avait été mouvementée !!

**Abdessamad Kobi**, merci pour nos éternels débats autour des statistiques et de nous avoir épaulé et orienté tout au long de ce projet !!

Je remercie mes **nouveaux collègues du MziSH** pour m'avoir supporté dans la dernière ligne droite rédactionnelle ! Merci à **Charlotte, Sébastien** et **Elodie** !

*Je ne remercierai jamais assez les personnes qui comptent le plus à mes yeux, mes amis et ma famille, mais je vais essayer quand même !*

*Caroline, Camille, merci pour tous les moments riches en émotion que nous avons pu partager, vous comptez énormément pour moi, sans vous, cela aurait été nettement plus difficile !*

*Victoire, Hélène, Julie, Amandine, Candice, ravie de constater à chaque instant que les distances ne remettent pas en question nos profondes amitiés,*

*Khaled, Clément, Aurélien, Gaël, Lucile, Chloé, Guillaume D. et Guillaume L., honorée d'avoir fait mon internat avec des personnes aussi drôles et entières !*

*Papa, Maman, tout simplement merci pour tout ce que vous avez fait pour que j'en arrive là, tout ce que vous faites encore, je vous dois tout, je vous aime de tout mon cœur,*

*Toute ma famille, merci pour votre soutien sans failles, je vous aime énormément,*

*Teva, merci pour ton soutien inconditionnel et ton amour, j'espère être à la hauteur de ce que tu me donnes ; je te promets que cette fois c'est la dernière thèse, il n'y en aura pas de troisième !!*

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	1
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	2
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	3
<b>INTRODUCTION</b> .....	4
<b>ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	7
1. La mucoviscidose.....	8
1.1. Le gène et la protéine CFTR .....	8
1.1.1. La protéine CFTR et ses fonctions.....	8
a. Structure.....	8
b. Localisation.....	10
c. Fonctions .....	10
1.1.2. Les mutations du gène <i>CFTR</i> .....	13
1.2. Manifestations cliniques .....	15
1.2.1. Atteintes du tractus gastro-intestinal.....	16
1.2.2. Atteinte cutanée .....	16
1.2.3. Atteintes du système reproducteur.....	17
1.2.4. Atteinte respiratoire .....	17
1.3. Colonisation des voies respiratoires et infections d'origine fongique .....	20
1.3.1. Méthodes de génotypage .....	21
a. Amplification aléatoire de fragments d'ADN polymorphe (RAPD).....	22
b. Amplification des séquences répétitives (rep-PCR) .....	23
c. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) .....	24
d. Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) .....	25
e. Analyse des microsatellites (STRs) .....	27
f. Analyse des séquences situées entre des motifs répétés (IRSS).....	27
g. Typage par séquençage de plusieurs loci (MLST).....	29
1.3.2. Colonisation des voies respiratoires par des levures .....	30
1.3.3. Champignons filamenteux et mucoviscidose .....	31
a. Espèces du genre <i>Aspergillus</i> .....	31
b. Espèces du complexe <i>Pseudallescheria boydii</i> / <i>Scedosporium apiospermum</i> .....	33
c. Autres espèces.....	35
2. Complexe d'espèces <i>Pseudallescheria boydii</i> / <i>Scedosporium apiospermum</i> .....	40
2.1. Morphologie.....	40
2.1.1. Aspect macroscopique.....	40
2.1.2. Aspect microscopique .....	41
a. Téléomorphe .....	41
b. Anamorphe.....	41
2.2. Taxonomie.....	43
2.2.1. Historique.....	43

2.2.2. Phylogénie actuelle .....	44
2.3. Pathogénicité .....	48
2.3.1. Infections localisées après un traumatisme .....	48
a. Mycétomes .....	48
b. Arthrites et ostéomyélites.....	49
c. Infections oculaires .....	50
2.3.2. Colonisation des poumons.....	50
a. Boules fongiques pulmonaires .....	50
b. Scédosporioses broncho-pulmonaires allergiques .....	51
2.3.3. Infections systémiques invasives .....	52
a. Scédosporioses pulmonaires invasives .....	52
b. Infections disséminées .....	53
c. Atteintes du système nerveux central (SNC).....	53
2.4. Écologie des espèces du complexe <i>P. boydii</i> / <i>S. apiospermum</i> .....	55
2.5. Méthodes de détection et d'identification.....	58
2.5.1. Méthodes culturales .....	58
a. Milieux de culture semi-sélectifs de première génération .....	59
b. Milieux de culture semi-sélectifs de dernière génération .....	60
2.5.2. Méthodes de détection non-culturales .....	61
a. Méthodes biochimiques.....	62
b. Méthodes moléculaires.....	62
2.5.3. Méthodes d'identification précise d'espèce.....	65
a. Séquençage de portions du génome.....	65
b. Spectrométrie de masse de type MALDI - TOF .....	66
<b>TRAVAIL EXPERIMENTAL</b> .....	68
ETUDE 1 : Distribution des différentes espèces du complexe <i>Pseudallescheria boydii</i> / <i>Scedosporium apiospermum</i> chez des patients français atteints de mucoviscidose.....	73
ETUDE 2 : Ecologie des différentes espèces du complexe <i>Pseudallescheria boydii</i> / <i>Scedosporium apiospermum</i> en France.....	93
ETUDE 3 : Détection et quantification du complexe d'espèces <i>Pseudallescheria boydii</i> / <i>Scedosporium apiospermum</i> dans des échantillons de sol par PCR quantitative.....	118
<b>DISCUSSION GENERALE &amp; PERSPECTIVES</b> .....	133
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	148
<b>ANNEXES</b> .....	167

# LISTE DES ABREVIATIONS

ABPA	Aspergillose broncho-pulmonaire allergique
ABPM	Mycose broncho-pulmonaire allergique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
AFLP	<i>Amplification fragment length polymorphism</i>
AMPc	Adénosine monophosphate cyclique
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adénosine triphosphate
BLASTn	<i>Basic local alignment search tool nucleotide</i>
BT2	Fragment du gène codant la $\beta$ -tubuline
CAL	Fragment du gène codant la calmoduline
CBS	Centraalbureau for Schimmelcultures
CF	<i>Cystic fibrosis</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CFU	<i>Colony-forming unit</i>
DRBC	Dichloran rose bengal chloramphénicol
ENaC	<i>Epithelial Na channel</i>
F508del	Délétion de la phénylalanine en position 508
IHEM	<i>Institute of hygiene and epidemiology Mycology section</i>
IRSS	<i>Interspersed repetitive sequences</i>
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
MALDI-TOF/MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight/mass spectrometry</i>
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
NCBI	<i>National center for biotechnology information</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCR-ESI-TOF/MS	<i>Electrospray ionization-time of flight-mass spectrometry</i>
PSC	<i>Pseudallescheria boydii / Scedosporium apiospermum species complex</i>
RAMS	<i>Random amplification microsatellites</i>
RAPD	<i>Random amplification polymorphism DNA</i>
rep-PCR	<i>Repetitive element palindromic-PCR</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RLB-PCR	<i>Reverse line blot hybridization-PCR</i>
SNC	Système nerveux central
STRs	<i>Short tandem repeats</i>
TUB	Fragment du gène codant la $\beta$ -tubuline
VEMS	Volume expiratoire maximal par seconde
WWTP	<i>Wastewater treatment plant</i>
YPD	<i>Yeast extract - peptone - dextrose</i>
YPDA	<i>Yeast extract - peptone - dextrose agar</i>

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Position du gène <i>CFTR</i> sur le chromosome 7 et schéma de transcription et traduction en protéine CFTR, selon Collins (1992).....	9
Figure 2 : Représentation schématique de la protéine CFTR, selon Riordan <i>et al.</i> (1989).....	9
Figure 3 : Fonction canal chlore de la protéine CFTR, d'après Lebecque et Baran (2002)...	11
Figure 4 : Fonctions de la protéine CFTR et répercussions d'une mutation du gène <i>CFTR</i> dans la mucoviscidose, selon Kunzelmann et Schreiber (1999). ....	12
Figure 5 : Les 6 classes de mutations du gène <i>CFTR</i> , selon Boyle et de Boeck (2013). ....	13
Figure 6 : Altération du mucus bronchique des patients CF, selon Kunzelmann et Schreiber (1999). ....	18
Figure 7 : Fréquence d'isolement des bactéries dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose en fonction de l'âge, selon Bellis <i>et al.</i> (2007). ....	20
Figure 8 : Profils RAPD obtenus par Lass-Flörl <i>et al.</i> (200) pour les souches d' <i>A. terreus</i> isolées de neuf patients et d'échantillons environnementaux.....	22
Figure 9 : Schéma de la Rep-PCR automatisée, selon Healy <i>et al.</i> (2004). ....	23
Figure 10 : Les étapes de la technique d'AFLP, selon Mueller et Wolfenbarger (1999).....	26
Figure 11 : Les différentes étapes de l'analyse des microsatellites, selon Klaassen (2009)...	28
Figure 12 : Les différentes étapes du séquençage multi-loci, selon Klaassen (2009).....	29
Figure 13 : Profils RAPD de souches de <i>S. apiospermum</i> obtenus avec les amorces UBC 701 (A) et UBC 703 (B) dans le cas clinique publié par Symoens <i>et al.</i> (2006). ....	36
Figure 14 : Colonies de <i>S. apiospermum</i> à J3 (A), J7 (B) et J14 (C) cultivé sur milieu YPDA incubé à 37°C. Le verso est gris foncé à noir (D). ....	40
Figure 15 : Cléistothèce et ascospores de la forme sexuée <i>Pseudallescheria</i> (x100).....	41
Figure 16 : Conidies brunes, ovoïdes ou claviformes de la forme <i>Scedosporium</i> (x40).....	42
Figure 17 : Corémies caractéristiques du stade <i>Graphium</i> (x40).....	42
Figure 18 : Ascocarpes des Microascacées. ....	44
Figure 19 : Taxonomie du complexe d'espèces <i>P. boydii</i> / <i>S. apiospermum</i> , selon Gilgado <i>et al.</i> (2008).....	47
Figure 20 : Taux de mortalité observés pour 138 cas de scédosporioses pulmonaires invasives diagnostiqués entre 1955 et 2010, d'après Kantarcioglu <i>et al.</i> (2012). 53	

Figure 21 : Exemples de composés aromatiques dégradés par <i>S. apiospermum</i> .....	57
Figure 22 : Profils d'hybridation de 10 germes pouvant coloniser les voies aériennes des patients CF, selon Bouchara <i>et al.</i> (2009).....	64
Figure 23 : Position des régions ITS 1 et 2 au sein des gènes codant les ARN ribosomiaux....	65
Figure 24 : Principe de la technologie MALDI-TOF/MS, selon Croxatto <i>et al.</i> (2012).....	67
Figure 25 : Profil RAPD obtenu pour les isolats collectés à partir du patient P3 avec les amorces GC70 (A), UBC701 (B) et UBC703 (C).....	141
Figure 26 : ADN génomiques extraits avec le kit NucleoSpin® Soil.....	146
Figure 27 : Amplification par PCR à l'aide des amorces NS7 et Scedo1 de l'ADN extrait avec le kit NucleoSpin® Soil.....	147

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Fréquence des différentes manifestations cliniques au cours de la mucoviscidose, d'après Fiel (1993).....	15
Tableau 2 : Caractéristiques morphologiques et physiologiques des espèces du complexe <i>P. boydii</i> / <i>S. apiospermum</i> et de <i>S. prolificans</i> , d'après Gilgado <i>et al.</i> (2008). ....	46
Tableau 3 : Nomenclature des états sexués et asexués des espèces du complexe <i>P. boydii</i> / <i>S. apiospermum</i> . ....	46
Tableau 4 : Incidence des infections du SNC provoquées par <i>S. apiospermum</i> diagnostiquées de 1948 à 1998, d'après Nesky <i>et al.</i> (2000).....	54
Tableau 5 : Principaux facteurs de risque dans les cas de scédosporiose du SNC diagnostiqués de 1948 à 1998, d'après Nesky <i>et al.</i> (2000).....	54
Tableau 6 : Composition de différents milieux de culture, d'après Summerbell (1993) et Rainer <i>et al.</i> (2008). ....	60
Tableau 7 : Composition du milieu de culture semi-sélectif Scedo-Select III.....	61
Tableau 8 : Génotypes RAPD et identification moléculaire des isolats collectés à partir du patient P3. ....	141

# INTRODUCTION

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies héréditaires dans la population caucasienne et la troisième maladie rare en France. Ainsi, sur le territoire national, près de 5000 personnes sont concernées par cette pathologie à transmission autosomique récessive qui touche une naissance sur 2500. Bien que de nombreux organes soient touchés, le pronostic est essentiellement lié à l'atteinte respiratoire. La gravité des lésions pulmonaires dépend de la colonisation des voies respiratoires par les micro-organismes et de la réaction inflammatoire excessive qu'ils engendrent. Les bactéries sont de loin les principaux agents responsables de ces infections respiratoires. L'amélioration de leur prévention et de leur traitement est d'ailleurs à l'origine d'une augmentation importante de l'espérance de vie des patients au cours des 20 dernières années. Celle-ci s'est malheureusement accompagnée d'une augmentation de la fréquence des infections d'origine fongique. En effet, à un stade plus avancé de la maladie, les voies respiratoires des patients sont colonisées par des champignons filamenteux, notamment le complexe d'espèces *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* qui se situe au deuxième rang en fréquence, après *Aspergillus fumigatus*. La forte fréquence de ce complexe d'espèces au cours de la mucoviscidose nous conduit à nous interroger sur les sources de contamination des patients, sachant que contrairement à *A. fumigatus* qui est omniprésent dans l'environnement, le complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* est rarement décrit dans l'environnement. Une meilleure connaissance de l'habitat naturel de ce champignon filamenteux permettrait d'envisager des mesures préventives et ainsi de limiter l'utilisation curative des antifongiques triazolés ou d'éviter les réticences des cliniciens à l'inscription des patients colonisés sur la liste de greffe.

La première partie de ce manuscrit porte sur l'état actuel des connaissances sur la mucoviscidose d'une part. Les données génétiques et cliniques de cette pathologie sont abordées avec un focus tout particulier sur la caractérisation de la colonisation des voies respiratoires des patients par les champignons filamenteux. D'autre part, une synthèse des connaissances actuelles sur la biologie, la pathogénicité et l'écologie des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* est présentée, ainsi que les méthodes de détection et d'identification de ces champignons filamenteux.

Dans le deuxième chapitre qui correspond à la partie expérimentale, sont présentés les travaux que nous avons réalisés dans la cadre de cette thèse, à savoir : (i) l'estimation de la prévalence des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* dans le contexte de la mucoviscidose, article original publié dans la revue *Medical Mycology*; (ii) la définition de l'écologie de ce complexe dans le but d'identifier des sources potentielles de contamination

des patients, manuscrit aujourd'hui soumis pour publication; et (iii) le développement d'une méthode moléculaire de détection de ce complexe dans l'environnement.

Dans la dernière partie de ce manuscrit, les résultats obtenus sont discutés en soulignant les questions émanant des travaux présentés et en proposant des perspectives de recherche pour la poursuite de ces études.

**ANALYSE**  
**BIBLIOGRAPHIQUE**

# 1. La mucoviscidose

La mucoviscidose, aussi appelée fibrose kystique (*Cystic Fibrosis*, ou CF), est la plus fréquente des maladies génétiques autosomiques récessives dans la population caucasienne. En France, elle touche un enfant sur 2500 (Vankeerberghen *et al.*, 2002), et une personne sur 25 est hétérozygote (Collins, 1992). Bien qu'il n'existe pas de traitement curatif, les thérapies symptomatiques actuelles ont permis un accroissement important de l'espérance de vie, ainsi qu'une amélioration de la qualité de vie des patients.

## 1.1. Le gène et la protéine CFTR

La mucoviscidose survient suite à une ou plusieurs mutations du gène *CFTR* pour *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*, codant un canal chlore ATP-dépendant.

Le gène *CFTR*, identifié en 1985 et cloné en 1989, est localisé sur le bras long du chromosome 7 au niveau du segment q31.2 (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989). Ce gène présente une séquence de 230 kb et comprend 27 exons. Il est transcrit en un ARN messager de 6,1 kb, codant une protéine transmembranaire de 1480 acides aminés et d'une masse moléculaire de 170 kDa (Figure 1) (Riordan *et al.*, 1989 ; Collins, 1992).

### 1.1.1. La protéine CFTR et ses fonctions

#### a. Structure

La protéine CFTR présente deux motifs similaires comportant chacun un domaine transmembranaire hydrophobe (TM1 et TM2) constitué de six hélices  $\alpha$  et une région cytoplasmique hydrophile (NBF1 et NBF2) impliquée dans la liaison et le clivage de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire au transport ionique. Ces deux motifs sont séparés par un domaine cytoplasmique régulateur (R) qui expose à sa surface plusieurs résidus séril phosphorylables par la protéine kinase A AMPc-dépendante (Riordan *et al.*, 1989 ; Collins, 1992) (Figure 2).

De par ses caractéristiques structurales, la protéine CFTR appartient à la famille des transporteurs membranaires ATP-dépendants, que sont les protéines ABC (pour *ATP-Binding Cassette*).

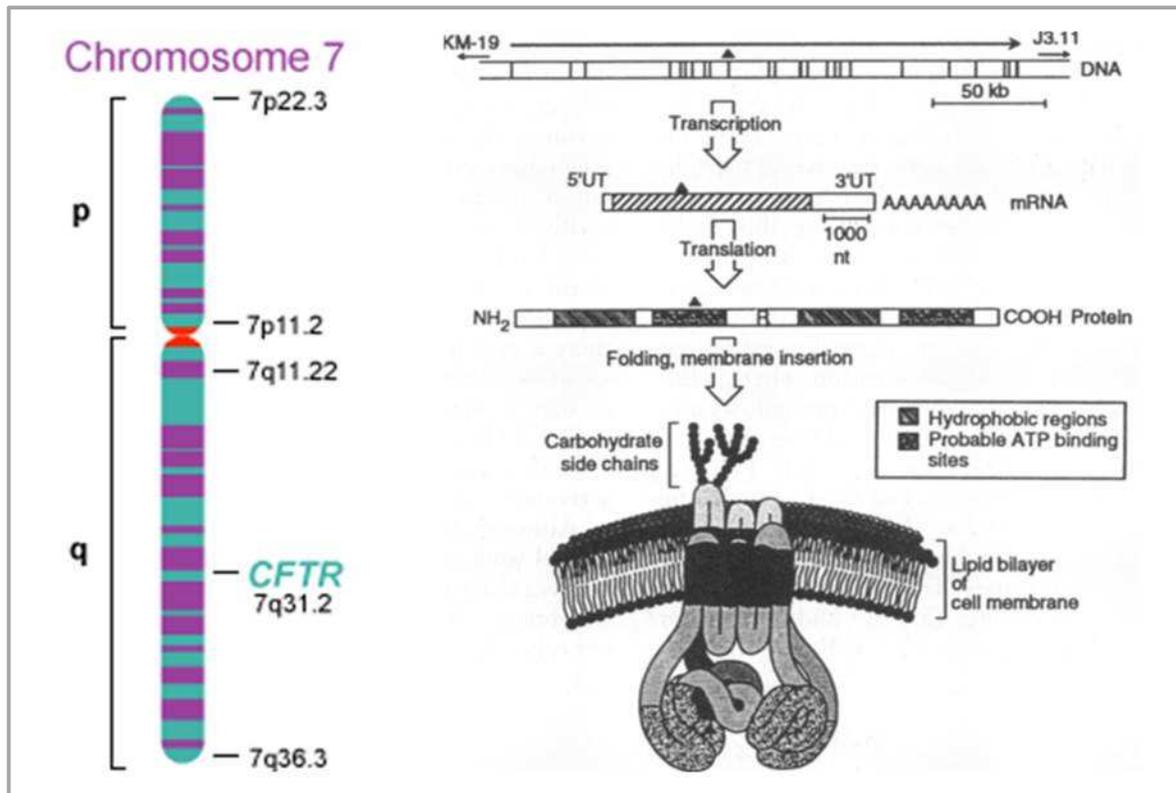


Figure 1 : Position du gène *CFTR* sur le chromosome 7 et schéma de transcription et traduction en protéine *CFTR*, selon Collins (1992).

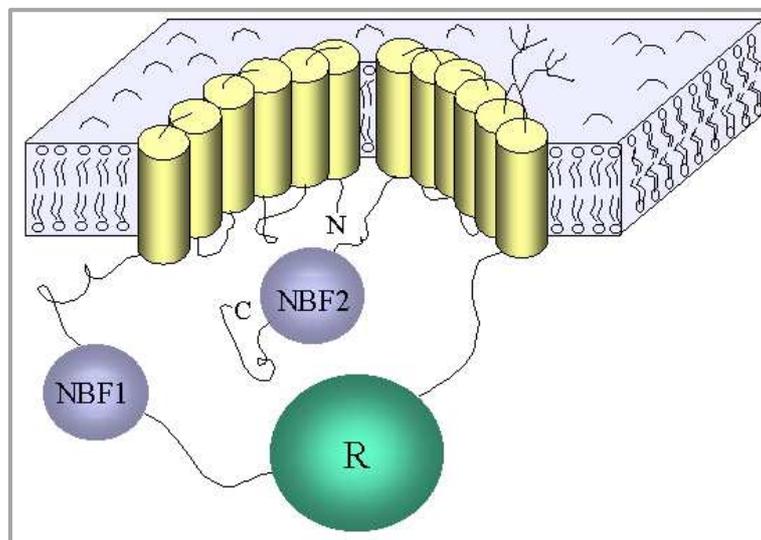


Figure 2 : Représentation schématique de la protéine *CFTR*, selon Riordan *et al.* (1989).

La protéine *CFTR* présente deux motifs similaires séparés par un domaine cytoplasmique régulateur (R, en vert). Chaque motif comporte un domaine transmembranaire hydrophobe constitué de six hélices  $\alpha$  (en jaune) et une région cytoplasmique hydrophile (NBF1 et NBF2, en gris).

## b. Localisation

La protéine CFTR est principalement localisée dans la région apicale et les endosomes (vésicules intracytoplasmiques destinées à être insérées dans la membrane apicale) des cellules de nombreux épithéliums tapissant les glandes exocrines. L'expression de la protéine CFTR a ainsi été retrouvée au niveau de l'épithélium des canaux pancréatiques, des canaux hépatiques, de la vésicule biliaire, des cryptes intestinales, des glandes salivaires, des canaux déférents dans le tractus génital mâle, de l'épididyme et des cellules du tube distal du rein (Kreda *et al.*, 2012). Au niveau de l'arbre respiratoire, le gène *CFTR* est exprimé dans de nombreuses cellules bronchiques (cellules ciliées des voies aériennes proximales et distales, cellules de canaux collecteurs glandulaires et cellules glandulaires séreuses), mais aussi dans des cellules bronchiolaires (cellules de Clara et cellules ciliées) et des cellules alvéolaires (pneumocytes de type II) (Lebecque and Baran, 2002).

L'expression du gène *CFTR* a aussi été détectée dans des tissus non-épithéliaux tels que les lymphocytes (Yoshimura *et al.*, 1991), l'hypothalamus (Mulberg *et al.*, 1998; Robert *et al.*, 2004), les muscles lisses (Robert *et al.*, 2004) et le cœur (Davies *et al.*, 2004). Même si le rôle de ces sites dans la mucoviscidose est moins évident que celui des organes munis d'un tissu épithélial, il n'en est pas moins significatif (Kreda *et al.*, 2012).

## c. Fonctions

En 1989, Riordan et ses collaborateurs ont mis en évidence, par transfection de l'ADNc du gène *CFTR* sauvage dans des cellules épithéliales pulmonaires de patients atteints de mucoviscidose, la fonction canal chlore de cette protéine, fonction qui par la suite a été confirmée par d'autres équipes (Riordan *et al.*, 1989; Drumm *et al.*, 1990; Rich *et al.*, 1990). Ce canal de faible conductance est perméable à différents anions selon la séquence suivante :  $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$  (Vankeerberghen *et al.*, 2002). Il est dit « bidirectionnel » ou « non-rectifiant » car il est impliqué aussi bien dans l'import que dans l'export de ces ions.

Les domaines transmembranaires TM1 et TM2 délimitent le pore du canal et le domaine R maintient le canal dans un état de fermeture. L'augmentation de l'AMPc intracellulaire, second messenger d'une multitude d'hormones ayant un récepteur membranaire, induit la phosphorylation par la protéine kinase A du domaine R de la protéine CFTR au niveau des résidus séryl. En parallèle, la fixation de l'ATP sur les domaines cytoplasmiques NBF1 et NBF2

et son hydrolyse provoquent des changements de conformation de la protéine CFTR ce qui permet l'ouverture du canal et donc le passage des ions chlorure (Figure 3) (Collins, 1992).

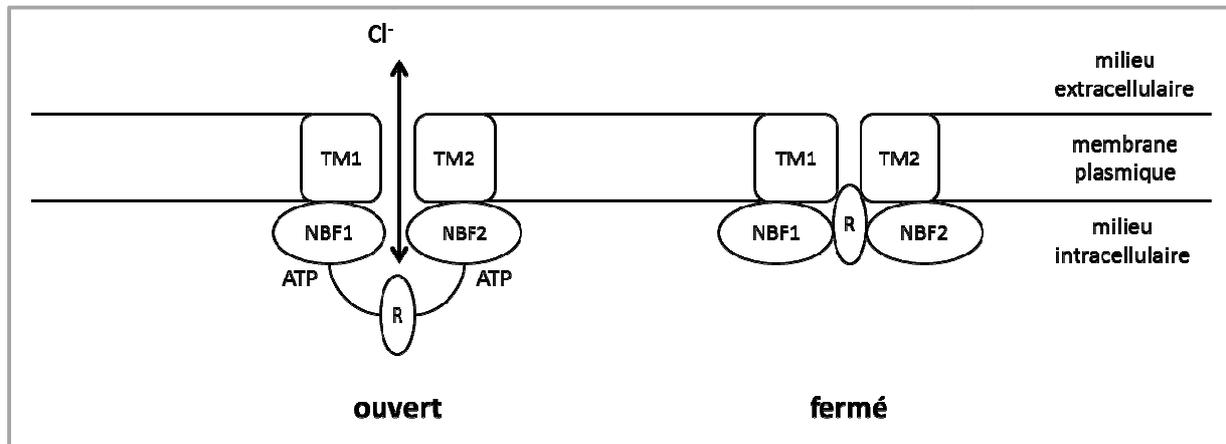


Figure 3 : Fonction canal chlore de la protéine CFTR, d'après Lebecque et Baran (2002).

Dans les années 1990, de nombreuses études ont par ailleurs établi que la protéine CFTR présente une fonction régulatrice des transports réalisés au niveau d'autres canaux (Figure 4). Ainsi, activée par l'AMPc, la protéine CFTR empêche l'absorption du sodium par inhibition des canaux sodiques sensibles à l'amiloride, qui appartiennent à la famille des canaux sodiques épithéliaux « ENaC » (pour *Epithelial Na Channel*) situés au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales (Kunzelmann and Schreiber, 1999). De plus, son activation stimule les aquaporines, favorisant le transport de l'eau à travers les membranes apicales et basales des cellules épithéliales. Enfin, en participant à l'absorption des ions chlorure, la protéine CFTR influe sur la perméabilité de l'échangeur  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  pour les ions bicarbonates et est impliquée dans la régulation des pH intra- et extracellulaire (Kunzelmann and Schreiber, 1999), ainsi que de ceux de l'appareil de Golgi, des prélysosomes et des endosomes (Vankeerberghen *et al.*, 2002).

Des fonctions secondaires de la protéine CFTR ont aussi été répertoriées, comme la stimulation de certaines glycoprotéines, notamment les mucines qui protègent la surface des cellules épithéliales en formant une barrière vis-à-vis des micro-organismes ou autres particules (Kuver *et al.*, 1994), et la régulation de la synthèse et de la sécrétion de cytokines de l'inflammation.

CFTR-Function	Cystic Fibrosis	Defect
		Defective NaCl secretion
		Hyperabsorption of NaCl
		Attenuation of NaCl secretion
		Attenuation of NaCl and K <sup>+</sup> secretion
		Impaired HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> secretion
		Impaired water transport

Figure 4 : Fonctions de la protéine CFTR et répercussions d'une mutation du gène *CFTR* dans la mucoviscidose, selon Kunzelmann et Schreiber (1999).

### 1.1.2. Les mutations du gène *CFTR*

À l'heure actuelle, plus de 1900 mutations du gène *CFTR* ont pu être identifiées. La mutation la plus commune est la délétion d'un codon de l'exon 10 aboutissant à la perte de la phénylalanine en position 508 (F508del). Près de 90% des patients atteints de mucoviscidose dans le monde sont hétérozygotes pour cette mutation, et environ 50% sont homozygotes (Boyle and De Boeck, 2013). L'ensemble des mutations est réparti en six classes selon l'anomalie moléculaire connue ou prédite (Mickle and Cutting, 2000; Vankeerberghen *et al.*, 2002; Witt, 2003; Boyle and De Boeck, 2013) (Figure 5).

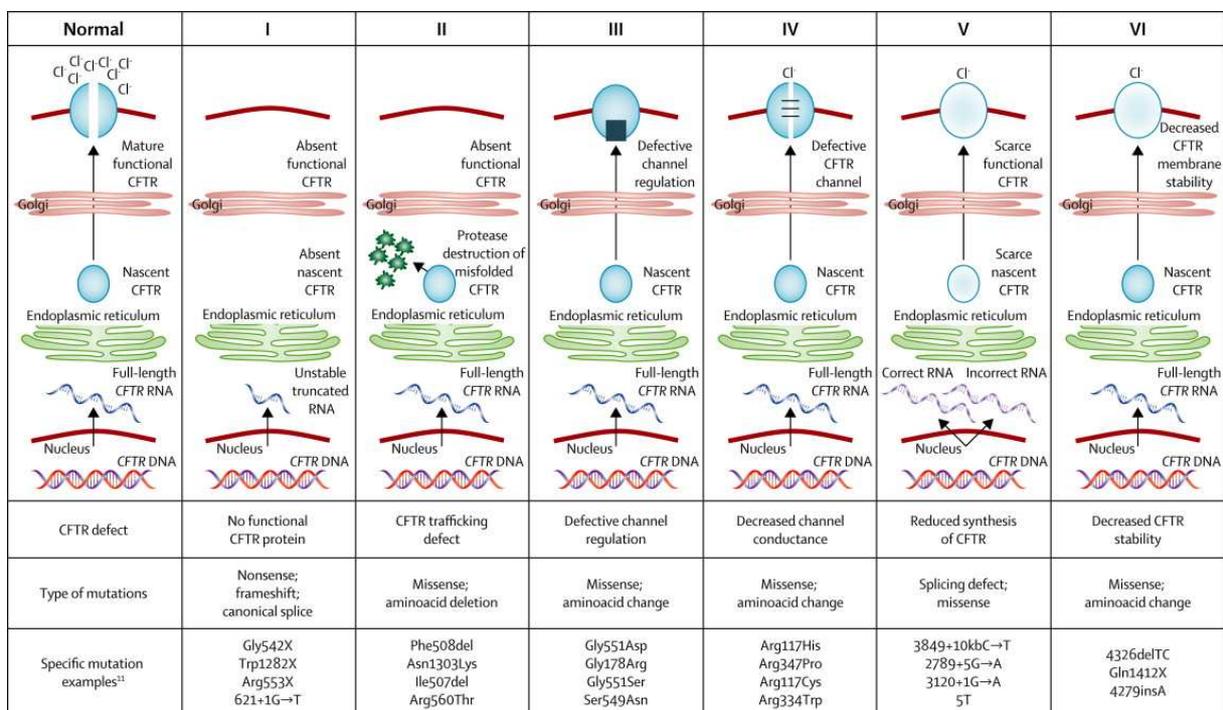


Figure 5 : Les 6 classes de mutations du gène *CFTR*, selon Boyle et de Boeck (2013).

La classe I regroupe les mutations altérant la synthèse de la protéine CFTR. Elles résultent de l'introduction prématurée d'un signal de terminaison de la traduction (codon stop) dans l'ARN messager. Ce sont généralement des mutations non sens conduisant à une synthèse incomplète de la protéine et/ou des insertions/délétions induisant un décalage du cadre de lecture. En conséquence, les transcrits sont tronqués et les protéines aberrantes ainsi formées sont rapidement dégradées. On peut citer à titre d'exemples les mutations Gly542X (ou G542X) et Trp1282X (ou W1282X).

La classe II comprend les mutations les plus communes dont la délétion F508del. Elles affectent la maturation cellulaire de la protéine CFTR et son transport vers la membrane cytoplasmique des cellules épithéliales. Chez les sujets sains, la protéine CFTR est insérée dans la membrane du réticulum endoplasmique pour être glycosylée et devenir résistante aux protéases, ce phénomène faisant intervenir des protéines chaperonnes. Chez les patients CF présentant des mutations de classe II, la quasi-totalité des protéines CFTR synthétisées ne peut pas être changée en forme résistante aux protéases, elles sont donc rapidement dégradées au sein des protéasomes cytosoliques. Pour les patients homozygotes F508del, le faible taux de protéine CFTR qui parvient malgré tout à la surface des cellules épithéliales varie en fonction des tissus (Kälin *et al.*, 1999).

Pour les classes III et IV, les protéines CFTR sont acheminées jusqu'à la membrane apicale des cellules épithéliales, le fonctionnement du canal est affecté. En effet, les mutations de classe III affectent le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP intervenant dans l'activation de la protéine CFTR, avec pour conséquence un défaut du contrôle de l'ouverture du canal chlore. La protéine mutée est alors présente à la surface des cellules épithéliales, mais s'ouvre rarement. La mutation la plus commune de cette classe est le remplacement d'une glycine par un acide aspartique en position 551 (Gly551Asp ou G551D) ce qui entraîne une diminution de l'aptitude de la cellule à détecter l'ATP intracellulaire et une absence de signal d'ouverture. Dans la classe IV, la régulation par l'ATP est normale, l'ouverture du canal est donc correcte. Les mutations affectent les acides aminés des régions transmembranaires, localisés à l'intérieur du pore du canal, et provoquent une altération de la conductivité du canal et de la sélectivité ionique. Citons à titre d'exemple la mutation Arg117His (ou R117H) qui se traduit par le remplacement d'une arginine par une histidine en position 117.

La classe V réunit les mutations provoquant une réduction de la quantité de protéines CFTR fonctionnelles au niveau de la membrane cellulaire du fait d'un épissage anormal ou d'un transport défaillant de la protéine jusqu'à la membrane. Le variant 5T du polymorphisme situé au sein de l'intron 8 du gène *CFTR* peut par exemple induire un épissage anormal.

Les mutations de classe VI sont rares. Elles sont responsables d'une diminution de la stabilité de la protéine CFTR ou affectent la régulation des autres canaux ioniques par la protéine CFTR. C'est le cas par exemple de la délétion de la thymine et de la cytosine présentes en position 4326 et 4327 (4326delTC).

En général, les classes I, II et III affectent plus gravement la quantité de protéines CFTR fonctionnelles que les classes IV et V. Une mutation peut conduire à un ou plusieurs

mécanismes présentés dans les classes ci-dessus : par exemple, la mutation G551D affecte le contrôle de l'ouverture (classe III) ainsi que la régulation des autres canaux ioniques par la protéine CFTR (classe VI).

## 1.2. Manifestations cliniques

Tous les patients atteints de mucoviscidose ne présentent pas les mêmes tableaux cliniques, même s'ils présentent des mutations identiques (Vankeerberghen *et al.*, 2002) et même s'ils appartiennent à la même famille (Witt, 2003). Ceci suggère que d'autres facteurs héréditaires, mais aussi des facteurs environnementaux, influent le phénotype de la mucoviscidose.

La protéine CFTR étant exprimée par les cellules épithéliales tapissant les glandes exocrines, la mucoviscidose atteint tous les organes présentant un tissu épithélial : les voies respiratoires, le pancréas, les voies biliaires, l'intestin, les glandes sudoripares et le tractus génital (Tableau 1).

**Tableau 1 : Fréquence des différentes manifestations cliniques au cours de la mucoviscidose, d'après Fiel (1993).**

Organes atteints	Fréquence	Organes atteints	Fréquence
<b>Appareil respiratoire</b>		<b>Tractus gastro-intestinal</b>	
<i>Voies aériennes supérieures</i>		insuffisance pancréatique	85%
polypes nasaux	6-20%	iléus méconial	10%
pansinusite	90-100%	iléus stercoral	10-30%
<i>Tractus respiratoire inférieur</i>		prolapsus rectal	20%
bronchiolite	100%	invagination intestinale	1%
bronchite	100%	pancréatite	5%
bronchectasies	100%	<b>Foie</b>	
<b>Glandes endocrines</b>		lithiase biliaire	12%
diabète sucré	15%	stéatose	20%
retard pubertaire	85%	cirrhose biliaire focale	20%
<b>Système reproducteur</b>		cirrhose multiloculaire	5%
azoospermie obstructive	98%	<b>Sueur</b>	
mucus cervical épais	5%	Cl <sup>-</sup> > 60 mmol/L	98%

### 1.2.1. Atteintes du tractus gastro-intestinal

L'absence ou le mauvais fonctionnement de la protéine CFTR se traduit par un déséquilibre des concentrations en ions (bicarbonates, sodium, chlorure) de part et d'autre de la membrane apicale des cellules épithéliales et par la production de sécrétions pauvres en eau qui risquent de provoquer l'obstruction, voire l'atrophie des canaux sécréteurs. Ainsi, le suc pancréatique, la bile et les sécrétions intestinales, pauvres en eau et en bicarbonates, sont visqueux et acides. La plupart des patients CF (85%) présentent une insuffisance pancréatique : le suc pancréatique ne peut plus neutraliser l'acidité du contenu gastrique arrivant dans le duodénum. Les enzymes pancréatiques (peptidases, amylases, lipases, nucléases, ...), actives seulement à pH alcalin, sont incapables de digérer les protéines, lipides et glucides contenus dans l'alimentation. De plus, le déficit en eau des sécrétions pancréatiques provoque une précipitation des enzymes pancréatiques. La viscosité de ces sécrétions déshydratées ne leur permettant pas de rejoindre le tube digestif, les enzymes pancréatiques sont refoulées dans le pancréas et peuvent être à l'origine de son autodigestion et d'une fibrose des canalicules et des acini. Ainsi, 15% des patients atteints de mucoviscidose risquent de développer un diabète (Vankeerberghen *et al.*, 2002). Le mauvais transit de la bile visqueuse se manifeste par la survenue d'une cirrhose hépatique pour 20% des patients CF (Witt, 2003).

À la naissance des patients atteints de mucoviscidose, un retard dans l'émission du méconium, trop pauvre en eau et en sel d'une part, et trop riche en protéines et lipides non digérés d'autre part, peut être observé. Environ 15% de ces nouveau-nés présentent même une absence d'évacuation du méconium (iléus méconial). À un âge plus avancé, 14,8% des patients CF présentent une stéatorrhée (présence de graisses dans les selles) associée à des problèmes nutritionnels à cause de la maldigestion des aliments et de la malabsorption des nutriments (Lebecque and Baran, 2002).

### 1.2.2. Atteinte cutanée

L'atteinte des glandes sudoripares au cours de la mucoviscidose se caractérise par une absence partielle ou complète de réabsorption des ions sodium et chlorure sécrétés naturellement par la sueur au niveau de la peau, conduisant à une concentration élevée de la sueur en chlorure de sodium (NaCl). Cette anomalie retrouvée chez 98% des patients est à la base du développement du test de la sueur qui fait partie des examens classiques du

diagnostic de la mucoviscidose. La concentration moyenne en NaCl de la sueur des patients CF est d'environ 100 mM/L, les valeurs variant de 60 à 160 mM/L. Pour les 2% des patients CF dont la sueur présente des concentrations en NaCl inférieures ou égales à 60 mM/L, le diagnostic de mucoviscidose est bien souvent retardé (Vankeerberghen *et al.*, 2002).

### 1.2.3. Atteintes du système reproducteur

Une diminution de la fertilité, due à une mauvaise hydratation et donc un épaissement du mucus cervical, est un phénomène rarement retrouvé chez les femmes atteintes de mucoviscidose. Cependant, il constitue, s'il existe, un obstacle à la progression des spermatozoïdes dans le canal endocervical (Ødegaard *et al.*, 2002). À l'inverse, 95% à 98% des hommes atteints de mucoviscidose sont stériles par absence des canaux déférents qui assurent le transport des spermatozoïdes des testicules vers la prostate (Vankeerberghen *et al.*, 2002; Witt, 2003).

### 1.2.4. Atteinte respiratoire

Chez les patients atteints de mucoviscidose, la mutation du gène *CFTR* conduit à un défaut de sécrétion du NaCl au niveau du pôle apical des cellules épithéliales respiratoires. Ce phénomène est accentué par la levée de l'inhibition exercée normalement par la protéine CFTR sur les canaux sodiques épithéliaux ENaC, ce qui se traduit par une hyperabsorption du NaCl. Ce flux de NaCl s'accompagne alors d'une hyperabsorption d'eau qui ne peut pas être compensée par les aquaporines, ces dernières n'étant plus activées par la protéine CFTR (Figure 5). Il en résulte une déshydratation du liquide de surface bronchique, la phase gel prédominant sur la phase aqueuse alors que ces deux phases constitutives du mucus sont normalement en équilibre (Figure 6). Ainsi, les cils des cellules épithéliales se retrouvent englués dans la phase gel et leur mouvement est entravé. La clairance mucociliaire n'assure plus son rôle protecteur de l'appareil respiratoire vis-à-vis des particules et des germes inhalés (Kunzelmann, 2001).

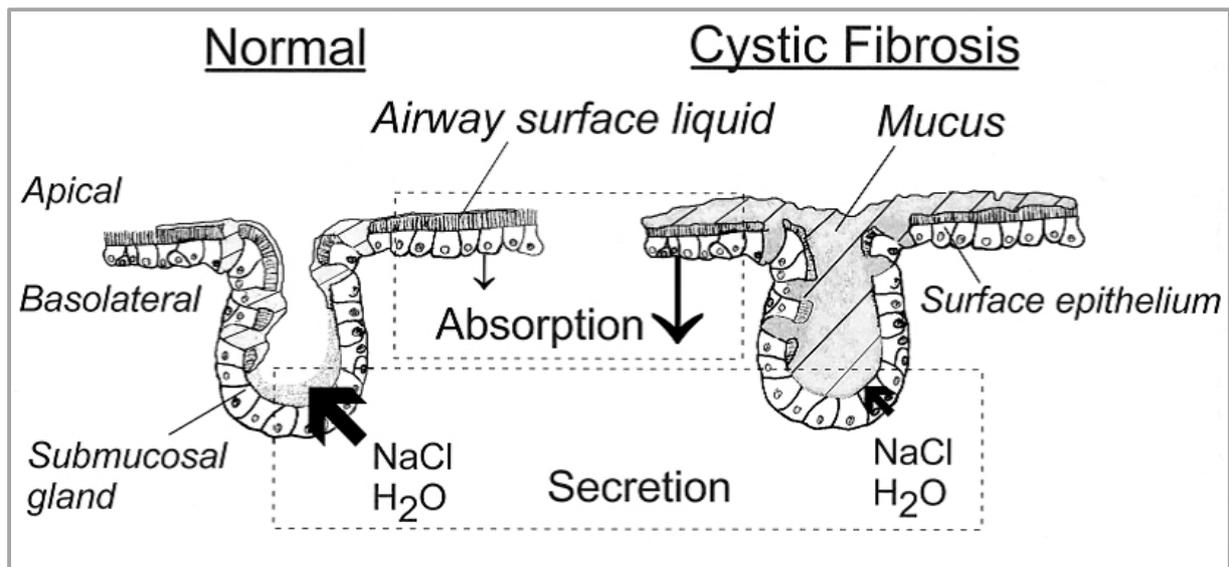


Figure 6 : Altération du mucus bronchique des patients CF, selon Kunzelmann et Schreiber (1999).

L'hyperabsorption couplée au défaut de sécrétion de NaCl et d'eau à travers la membrane apicale des cellules épithéliales respiratoires conduit à une altération de la composition du mucus bronchique des patients CF.

À la naissance, les poumons de patients CF sont normaux. Mais rapidement, dès les premiers mois de vie, les sécrétions respiratoires devenant trop visqueuses, les voies aériennes s'obstruent et un infiltrat inflammatoire se forme au niveau des parois des voies aériennes, participant à leur destruction. Ainsi, chez les jeunes enfants, la toux est intermittente et rythmée par les infections. Au fur et à mesure, elle persiste même entre les épisodes infectieux. Chez l'enfant plus âgé, la toux devient grasse et productive, et des infections des voies respiratoires inférieures surviennent : broncho-pneumonies, bronchiolites ou bronchites. Chez l'adulte, les tableaux cliniques peuvent différer d'un patient à un autre. Le plus souvent, des épisodes d'exacerbation des symptômes respiratoires sont observés. La toux devient plus productive et peut s'accompagner d'une diminution de l'appétit ayant rapidement un retentissement sur le poids des patients. Une surveillance régulière comportant la spirométrie (détermination de la Capacité Vitale Forcée, CVF, et du Volume Expiré Maximal en une Seconde, VEMS, exprimés en pourcentage de la valeur théorique) et l'analyse bactériologique et mycologique des crachats est alors indispensable pour enrailler cette évolution.

L'hyperviscosité du liquide de surface bronchique et l'altération de la clairance mucociliaire des patients atteints de mucoviscidose fournissent un environnement propice au développement des germes inhalés. Ces micro-organismes peuvent être à l'origine d'une colonisation transitoire de l'appareil respiratoire avec deux risques majeurs : l'évolution vers une colonisation chronique et la survenue d'infections respiratoires. Les infections de

l'appareil respiratoire sont un problème important pour ces patients puisque la sévérité de l'atteinte respiratoire conditionne dans la majorité des cas le pronostic vital.

Les infections respiratoires d'origine virale concernent principalement les jeunes enfants. Parmi les virus impliqués dans une symptomatologie respiratoire, le virus respiratoire syncytial et le virus influenza sont les plus fréquemment observés. Bien que ces infections surviennent avec la même fréquence que chez les individus sains, elles provoquent dans le contexte de la mucoviscidose une détérioration progressive de la fonction respiratoire des patients. Une hypothèse selon laquelle elles favoriseraient la survenue d'infections par des bactéries colonisant l'appareil respiratoire en leur facilitant l'accès à la membrane basale des cellules respiratoires est souvent formulée (van Ewijk *et al.*, 2005 ; Lipuma, 2010).

*Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa* sont les principales bactéries isolées des expectorations des patients CF quel que soit leur âge (Figure 7), leur fréquence respective étant de 61,5% et 42,6% chez les 6046 patients recensés dans le Registre Français de la Mucoviscidose en 2011 (Bellis *et al.*, 2013). *Haemophilus influenzae* est isolé avec une fréquence de 22,1% au cours des 20 premières années de vie des patients. D'autres pathogènes qualifiés d'opportunistes, tels que *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter xylosoxidans* sont retrouvés dans les crachats des patients CF avec des fréquences inférieures à 10%. Des bactéries rarement décrites hors du contexte de la mucoviscidose, telles que *Burkholderia cepacia* sont aussi rencontrées, mais avec des fréquences faibles de 2 à 4%. Toutefois, il est important de noter que même si la colonisation par *B. cepacia* est rare, elle n'en est pas pour autant anodine. Le suivi d'une cohorte de patients CF colonisés par *B. cepacia* comparée à un groupe témoin de patients CF non colonisés par ce micro-organisme a établi que la colonisation par cette bactérie était à l'origine d'une mortalité à long terme plus importante. Ainsi, une colonisation par *B. cepacia* serait responsable d'une diminution de la survie à long terme des patients CF sans avoir nécessairement d'effet délétère sur la fonction pulmonaire (Frangolias *et al.*, 1999). L'amélioration de la prise en charge de ces infections / colonisations d'origine bactérienne par le développement des thérapeutiques antibiotiques a conduit à une augmentation significative de l'espérance de vie des patients atteints de mucoviscidose. Lors de la création de l'association Vaincre La Mucoviscidose en 1965, l'espérance de vie était de sept ans. Un bilan des données disponibles réalisé 40 ans après par l'Observatoire National de la Mucoviscidose a établi que l'espérance de vie des patients CF était de 47 ans pour les patients nés entre 2003 et 2005, et de 39 ans pour ceux nés entre 1999 et 2001 (Bellis *et al.*, 2007).

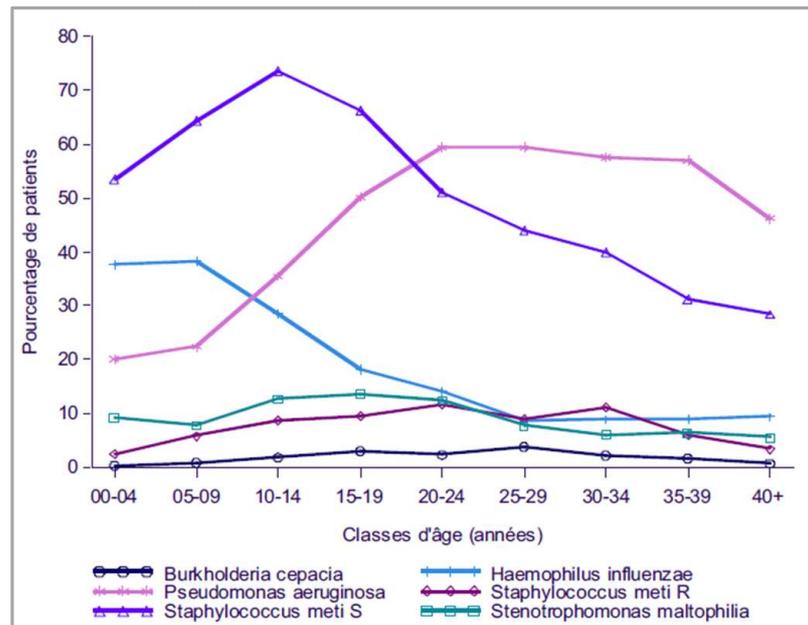


Figure 7 : Fréquence d'isolement des bactéries dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose en fonction de l'âge, selon Bellis et al. (2007).

### 1.3. Colonisation des voies respiratoires et infections d'origine fongique

Dans ce contexte lésionnel permanent entretenu par les bactéries, les poumons des patients CF sont dans un second temps la cible de levures et de champignons filamenteux, aboutissant à des situations de multicolonisation.

L'étude et la caractérisation de la colonisation des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose par les levures et/ou les champignons filamenteux nécessitent le développement de méthodes de détection et d'identification précise des espèces en présence, mais aussi de méthodes de typage adéquates. Pour être les plus informatives possibles, ces dernières doivent être utilisées sur différents isolats provenant d'une même expectoration (étude du polymorphisme génétique à un moment donné) et d'expectorations successives collectées au cours d'un suivi longitudinal des patients CF.

Dans un premier temps, les principes de différentes méthodes de typage seront abordés. Puis dans un second temps, la caractérisation de la colonisation des voies respiratoires par les levures et les champignons filamenteux à l'aide du génotypage sera présentée, ainsi que les manifestations cliniques associées.

### 1.3.1. Méthodes de génotypage

Le typage de micro-organismes consiste en une caractérisation fine d'isolats au sein d'une même espèce. Son objectif est principalement épidémiologique. Les méthodes de typage permettent par exemple de déterminer l'origine d'un germe responsable d'une infection, qu'il ait été transmis par un autre individu, acquis à partir de l'environnement, ou qu'il soit devenu pathogène alors qu'il appartenait à la flore normale de l'hôte. Pour les infections récurrentes ou persistantes, le typage permet de différencier un échec thérapeutique (les récurrences sont alors déterminées par la même souche) d'une réinfestation (il y a alors remplacement de la première souche par une autre de génotype différent). De même, le typage peut déterminer si une nouvelle thérapie provoque une modification de l'épidémiologie d'un pathogène opportuniste (Gil-Lamaignere *et al.*, 2003).

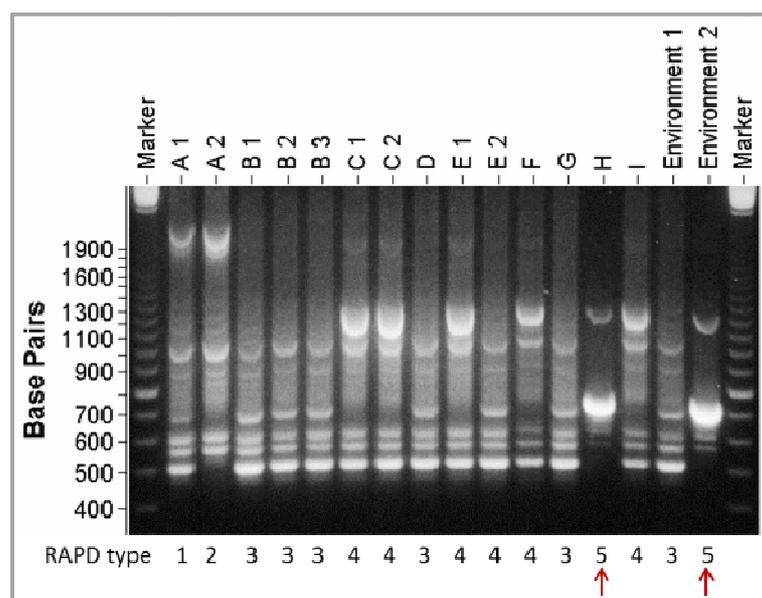
Les méthodes de typage se déclinent sous deux grandes formes : les méthodes phénotypiques, et les méthodes génotypiques. Les méthodes basées sur l'étude du phénotype des isolats ont pour la plupart été développées dans les années 80. Certaines (morphotypage, résistotypage ou système « killer ») sont aujourd'hui abandonnées, alors que d'autres sont à la base de tests diagnostiques encore utilisés en milieu hospitalier. Ainsi, le biotypage de levures du genre *Candida* différencie des isolats selon leur capacité à assimiler des hydrates de carbone grâce à des galeries commercialisées (Pincus *et al.*, 1999). De même, le sérotypage a permis de subdiviser le complexe d'espèces *Cryptococcus neoformans* / *Cryptococcus gattii* en deux variétés et cinq sérotypes (Bertout *et al.*, 1999; Nakamura, 2001; Firacative *et al.*, 2012; Kaocharoen *et al.*, 2013) : *C. neoformans* var. *grubii* (correspondant au sérotype A), *C. neoformans* var. *neoformans* (sérotype D), un hybride (sérotype AD) et *C. gattii* (sérotypes B et C) (Firacative *et al.*, 2012).

À ce jour, différentes méthodes permettent l'étude de la variabilité du génome des isolats au sein d'une même espèce. Les données fournies par ces méthodes de génotypage doivent être reproductibles, aussi bien au sein du même laboratoire que d'un laboratoire à l'autre. En effet, l'échange et le partage des données de typage permettent de réaliser des comparaisons multicentriques, et d'identifier des phénomènes tels que la dissémination d'un pathogène (Klaassen, 2009).

### a. Amplification aléatoire de fragments d'ADN polymorphe (RAPD)

La RAPD permet d'étudier le polymorphisme génétique de tous les micro-organismes puisque cette méthode ne nécessite pas de connaissances sur la séquence de leur ADN génomique (Williams *et al.*, 1990). En effet, cette méthode est basée sur l'amplification aléatoire de fragments d'ADN par une amorce unique de séquence courte (environ 10 paires de bases), choisie arbitrairement et utilisée à une température d'hybridation faible (de 20 à 36°C). Dans ces conditions, l'amorce s'hybride en différentes positions dans le génome et un nombre variable de fragments est amplifié. Il est toutefois nécessaire de tester un nombre important d'amorces pour chaque espèce. Les isolats sont alors classés en combinant les résultats obtenus pour les amorces les plus discriminantes. Après l'amplification, les fragments sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et des profils constitués de bandes de taille variable sont obtenus. On peut citer à titre d'exemple la mise en évidence d'un génotype commun à une souche clinique et une souche environnementale d'*Aspergillus terreus* isolée d'une plante en pot présente dans le centre hospitalier d'Innsbruck en Autriche (Figure 8) (Lass-Flörl *et al.*, 2000).

Cette méthode, simple de réalisation et peu coûteuse, présente néanmoins une faible reproductibilité intra- et inter-laboratoire et les profils de migration sont parfois difficiles à interpréter (de Valk *et al.*, 2008).



**Figure 8 : Profils RAPD obtenus par Lass-Flörl *et al.* (200) pour les souches d'*A. terreus* isolées de neuf patients et d'échantillons environnementaux.**

Le génotype 5, indiqué par les flèches rouges, a été isolé du patient H et de l'environnement.

### b. Amplification des séquences répétitives (rep-PCR)

La technique de rep-PCR est basée sur l'amplification de séquences répétitives non codantes réparties dans le génome. Les amorces de séquences définies et marquées au moyen d'un fluorophore se lient de manière spécifique aux nombreuses séquences répétitives dispersées dans le génome et amplifient de multiples fragments de différentes longueurs (Figure 9A). Les fragments obtenus sont séparés selon leur taille et leur charge à l'aide de puces analysant des petits volumes de liquide, dites microfluidiques. L'intensité de la fluorescence et le temps de migration permettent l'obtention d'électrophorégrammes pour chacun des échantillons (Figure 9B). Les données sont analysées à l'aide du logiciel DiversiLab® (bioMérieux) qui permet d'obtenir un dendrogramme (Figure 9C) (Healy *et al.*, 2004).

Développée dans un premier temps pour l'identification des isolats au rang d'espèce, cette méthode s'est avérée performante pour le génotypage de souches d'*A. terreus* par exemple (Healy *et al.*, 2004).

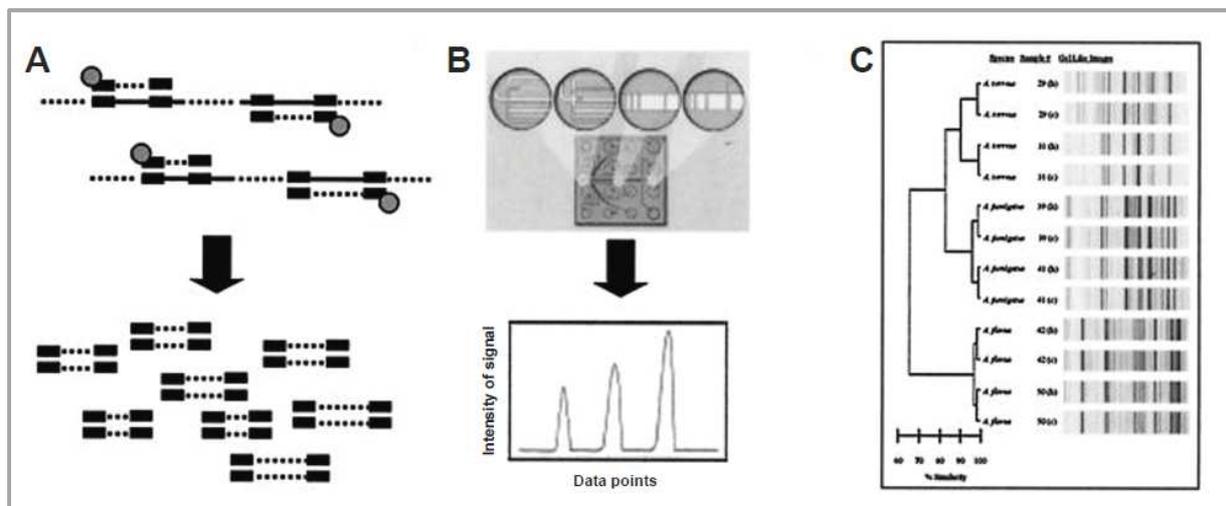


Figure 9 : Schéma de la Rep-PCR automatisée, selon Healy *et al.* (2004).

A : Hybridation spécifique des amorces et amplification ; B : Séparation sur des puces microfluidiques, et obtention d'électrophorégrammes ; C : Dendrogramme obtenu à l'aide du logiciel d'analyse de données DiversiLab®.

Cette méthode relativement simple et rapide nécessite cependant un appareillage particulier et coûteux. De plus, la reproductibilité inter-laboratoire (bien que meilleure que celle observée dans le cas de la RAPD) reste discutée.

### c. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)

#### ➤ **Sans hybridation**

La méthode de génotypage par RFLP consiste en une digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction et la séparation des fragments obtenus par migration sur gel d'agarose, celle-ci générant des profils de bandes de taille variable. Le polymorphisme des souches résulte alors de substitutions, de délétions ou d'insertions de nucléotides dans la séquence du site de restriction à l'origine de l'acquisition ou de la perte d'un site de restriction, mais aussi de délétions ou d'insertions dans les régions présentes entre les sites de restriction. La digestion aboutit à la formation d'un très grand nombre de fragments de petite taille (4 000 paires de bases en moyenne) dont la majorité ne peut être différenciée. C'est pourquoi les analyses de RFLP se focalisent sur les fragments dont la longueur est comprise entre 10 000 et 50 000 paires de bases (de Valk *et al.*, 2008).

#### ➤ **Avec hybridation**

Cette méthode a connu un certain engouement à la suite des travaux de Botstein *et al.* (1980) ont construit une carte génétique du génome humain à l'aide de marqueurs génétiques issus de la technique de typage RFLP. Le principe consiste à développer des sondes marquées capables de s'hybrider spécifiquement avec les fragments issus de la digestion de l'ADN génomique par des enzymes de restriction sélectionnées, et ainsi de réduire de manière drastique le nombre de fragments analysés (Botstein *et al.*, 1980). A la suite de la migration sur gel d'agarose, les fragments de restriction dénaturés sont transférés sur une membrane de nylon, puis celle-ci est incubée dans une solution de sonde préalablement marquée par un radioisotope ou par une enzyme. La sonde se fixe alors sur le ou les fragments d'ADN avec lesquels elle présente une homologie. Enfin, la révélation est réalisée selon le type de sonde, par contact avec un film sensible à la radioactivité, ou en réalisant une réaction enzymatique colorée spécifique. Les sondes correspondent le plus souvent à des séquences répétées dispersées dans le génome, le polymorphisme tient donc dans le fait que les souches présentent des variations dans le nombre de copies de ces séquences répétées et/ou dans les régions flanquantes des séquences cibles (de Valk *et al.*, 2008).

Relativement difficile à réaliser et à interpréter, cette méthode présente toutefois un fort pouvoir discriminant.

#### d. Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP)

Décrite pour la première fois en 1995 par Vos *et al.* (Vos *et al.*, 1995), la technique de génotypage par AFLP présente un pouvoir discriminant très important. L'ADN génomique est digéré par deux enzymes de restriction, l'une présente une forte fréquence de coupure et la seconde une fréquence moyenne. La fréquence de coupure varie avec la probabilité de présence du site de restriction : plus le site de restriction a une séquence longue, moins il sera présent dans le génome. Dans un second temps, des adaptateurs spécifiques des enzymes de restriction utilisées sont liés aux extrémités des fragments de restriction obtenus : c'est l'étape de ligation. Une amplification par PCR est ensuite réalisée à l'aide d'amorces marquées, spécifiques des adaptateurs. L'addition de nucléotides séquence-spécifiques aux extrémités 3' des amorces permet de moduler le nombre de fragments obtenus, chaque nucléotide ajouté permettant de diminuer leur nombre d'un facteur 4. Enfin, les produits de PCR sont visualisés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Figure 10).

Cette technique de génotypage est simple à réaliser. Cependant, la variation de l'intensité des bandes peuvent rendre complexe l'interprétation des profils. L'utilisation d'une électrophorèse capillaire et l'analyse des profils obtenus par un logiciel sont alors pertinentes, mais elles rendent cette méthode relativement onéreuse.

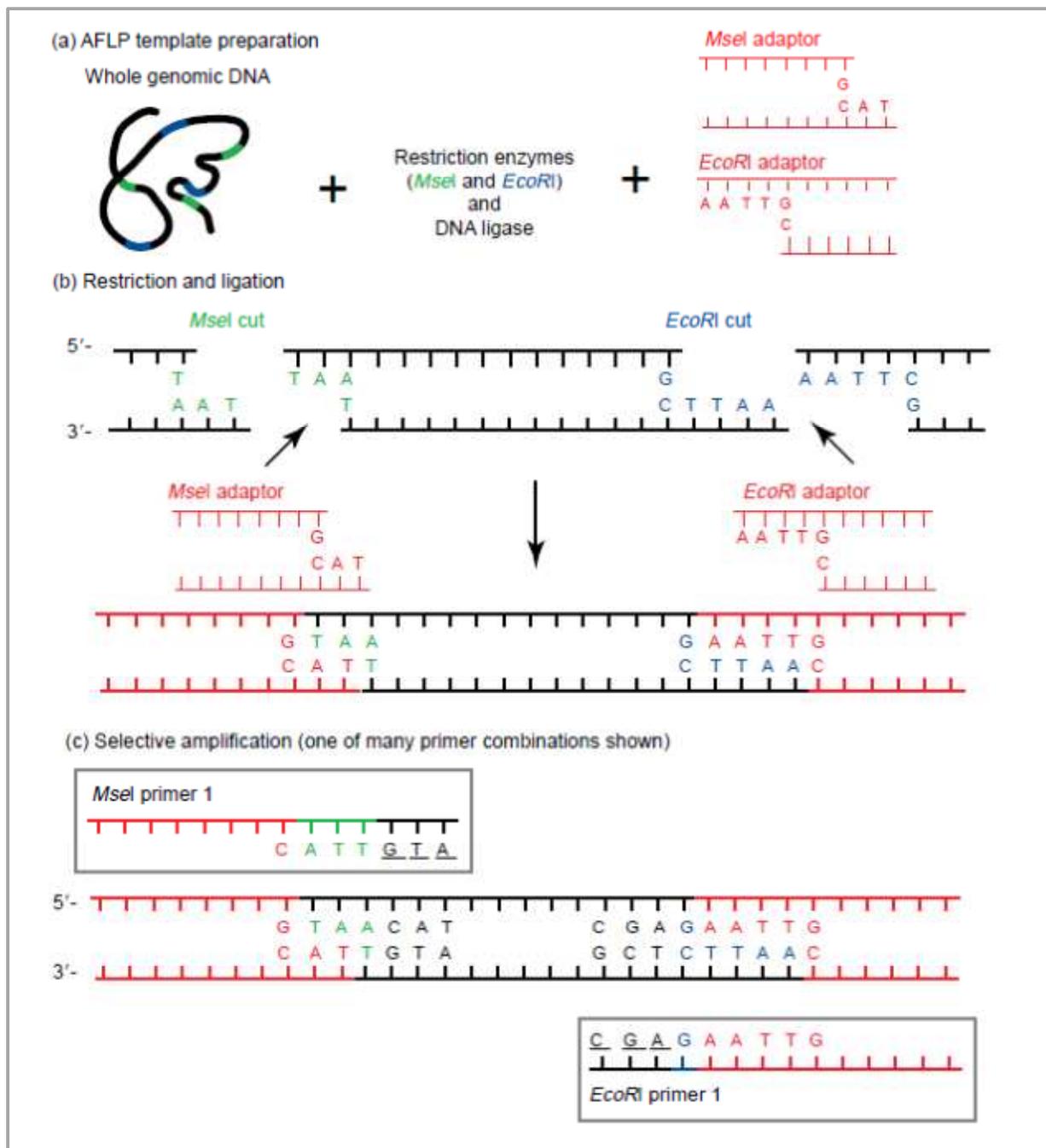


Figure 10 : Les étapes de la technique d'AFLP, selon Mueller et Wolfenbarger (1999).

### e. Analyse des microsatellites (STRs)

Les microsatellites sont des motifs répétés en tandem de 2 à 6 nucléotides, présents en grand nombre et dispersés dans le génome. Le génotypage par analyse des marqueurs microsatellites consiste en leur amplification par PCR à l'aide d'amorces spécifiques de leurs régions flanquantes. La taille des produits d'amplification est ensuite déterminée par électrophorèse capillaire. Par comparaison avec des fragments dont le nombre de répétitions a été déterminé par séquençage, il est possible de convertir la taille des amplicons en nombre de répétitions du motif au sein du marqueur. Ainsi, un génotype est défini par la combinaison des nombres de répétitions obtenus pour chacun des marqueurs analysés (Figure 11) (Klaassen, 2009).

Comme le génotypage par AFLP, le typage par analyse des microsatellites est relativement onéreux, mais simple de réalisation, et le pouvoir discriminant est très important. La présence d'artéfacts peut rendre délicate l'interprétation des résultats, mais ils peuvent être éliminés en modifiant les conditions des réactions de PCR. Enfin, les reproductibilités intra- et interlaboratoire sont excellentes (Klaassen, 2009).

### f. Analyse des séquences situées entre des motifs répétés (IRSS)

L'analyse des séquences d'ADN localisées entre des motifs microsatellites très rapprochés est basée sur l'amplification par PCR de ces régions par une amorce contenant une séquence microsatellite (di-, tri- ou tétranucléotidique) et une séquence dégénérée à l'extrémité 5'. Cette méthode est aussi appelée « amplification aléatoire de marqueurs microsatellites » (RAMS) de par sa ressemblance avec la RAPD (présentée précédemment). Un génotype est alors défini par la combinaison des différents résultats obtenus pour chacune des amorces (Cano *et al.*, 2005).

Cette méthode a l'avantage de présenter un grand pouvoir discriminant, comme en attestent les 111 génotypes identifiés parmi les 113 souches d'*A. terreus* étudiées par Neal et ses collaborateurs en 2011 (Neal *et al.*, 2011).



### g. Typage par séquençage de plusieurs loci (MLST)

Initialement décrite en 1998 par Maiden *et al.* pour la caractérisation de souches bactériennes (Maiden *et al.*, 1998), la technique de typage par séquençage de plusieurs loci s'est aussi révélée utile dans l'étude des champignons filamenteux (Taylor and Fisher, 2003). Cette méthode consiste en l'analyse des séquences nucléotidiques de portions de six à dix gènes constitutifs. Ces fragments sont constitués de 400 à 500 paires de bases. Pour chaque région génomique étudiée, les différentes séquences ADN obtenues correspondent à différents allèles et ceux-ci sont numérotés. La combinaison de l'ensemble des allèles identifiés définit le profil allélique ou la séquence type (ST) de la souche étudiée (Figure 12).

Cette méthode étant basée sur l'analyse des séquences nucléotidiques des micro-organismes, la reproductibilité interlaboratoire est excellente à condition d'utiliser les mêmes amorces et les mêmes conditions pour l'amplification par PCR. De même, les données obtenues peuvent être partagées via internet grâce à des logiciels particuliers qui permettent une harmonisation de la numérotation des allèles et des profils alléliques (Harun *et al.*, 2009; Klaassen, 2009).

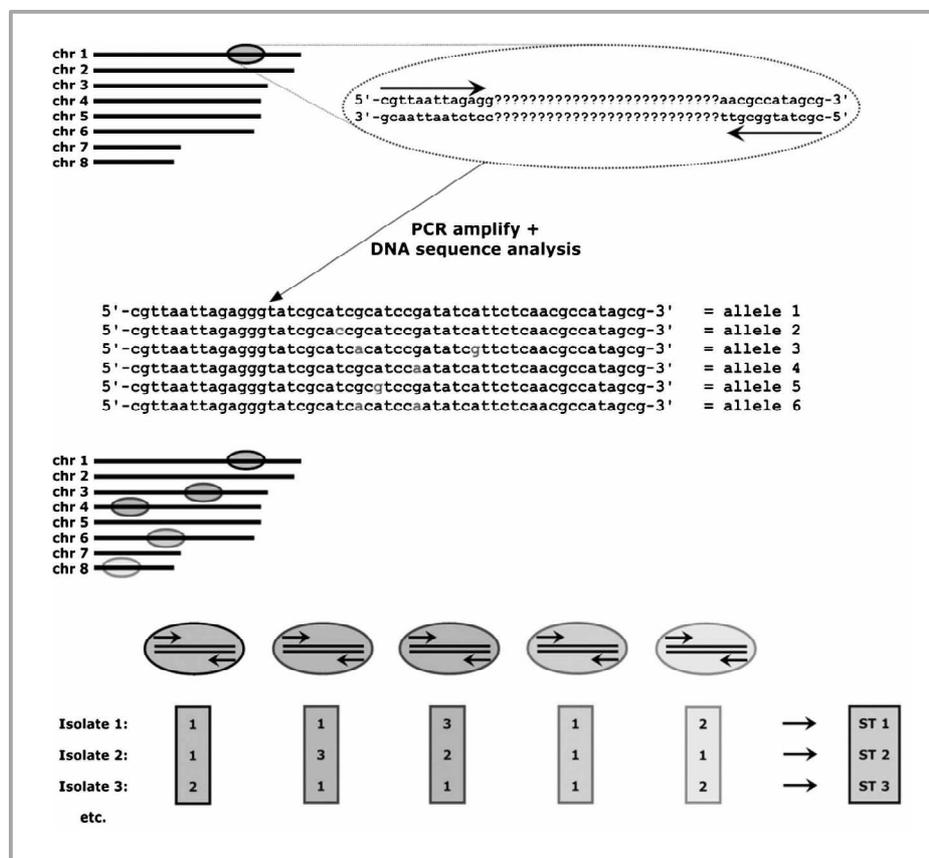


Figure 12 : Les différentes étapes du séquençage multi-loci, selon Klaassen (2009).

### 1.3.2. Colonisation des voies respiratoires par des levures

Les espèces du genre *Candida*, principalement *Candida albicans*, sont très fréquemment isolées des expectorations des patients atteints de mucoviscidose. Selon les études, 45% à 93% des patients CF sont positifs pour *C. albicans* (Haase *et al.*, 1991; Doern and Brogden-Torres, 1992; Bakare *et al.*, 2003; Valenza *et al.*, 2008; Muthig *et al.*, 2010), alors que les autres espèces sont rencontrées moins fréquemment : *C. dubliniensis* (11 à 13%), *C. glabrata* (5 à 7%), *C. parapsilosis* (4%), et *C. tropicalis* (1 à 6%) (Doern and Brogden-Torres, 1992; Muthig *et al.*, 2010). Cependant, bien que l'isolement de levures du genre *Candida* à partir des sécrétions bronchiques puisse être le reflet d'une colonisation réelle des patients CF, elle peut aussi résulter de la contamination des prélèvements par des levures commensales de la cavité buccale.

Comme pour les autres micro-organismes, le caractère transitoire ou persistant de la colonisation par les espèces du genre *Candida* est important à prendre en compte pour l'étude des répercussions cliniques de l'isolement de ces levures à partir des expectorations. L'analyse par RFLP et hybridation de souches de *C. albicans* issues de 324 crachats obtenus à partir de 56 patients atteints de mucoviscidose sur une période de 2,5 ans a établi qu'une persistance d'un même génotype, voire de génotypes très proches génétiquement, est possible. De plus, les auteurs ont aussi démontré qu'une transmission de ce pathogène au sein d'une même fratrie peut se produire (Muthig *et al.*, 2010).

D'autres espèces de levures ont été rapportées dans le cadre de la mucoviscidose, mais de manière sporadique, et leur aptitude à établir une colonisation chronique des voies respiratoires n'a pas été étudiée.

Ainsi, *Trichosporon mycotoxinivorans* est une levure pathogène récemment décrite dans le contexte de la mucoviscidose. Ce micro-organisme peut être responsable de colonisation des voies respiratoires et d'infections, comme des pneumonies ou des infections systémiques pouvant être fatales (Hickey *et al.*, 2009; Hirschi *et al.*, 2012).

De même, des levures du genre *Malassezia* ont été détectées par des méthodes moléculaires à partir d'expectorations de patients CF (Nagano *et al.*, 2010; Delhaes *et al.*, 2012).

### 1.3.3. Champignons filamenteux et mucoviscidose

La colonisation des voies respiratoires par les champignons filamenteux est rare chez les jeunes enfants (Cimon *et al.*, 1995). Lorsque les patients CF colonisés par les espèces du genre *Aspergillus* sont comparés aux patients CF non colonisés par des moisissures, ils s'avèrent être généralement plus âgés (23 ans versus 17,5 ans) et le plus souvent déjà colonisés de manière chronique par des bactéries (65% versus 48%) (Mortensen *et al.*, 2011).

#### a. Espèces du genre *Aspergillus*

La prévalence des espèces du genre *Aspergillus* dans la mucoviscidose varie de 6% à presque 60% pour *A. fumigatus* (Lipuma, 2010) et de 1,9% à 6,2% pour *A. terreus* (Cimon *et al.*, 1995; Cimon *et al.*, 2000), respectivement premier et troisième champignon filamenteux en fréquence dans ce contexte. Le risque de colonisation par *A. fumigatus* augmente avec l'âge et la prise d'antibiotiques inhalés. Elle est plus commune chez les patients CF dont l'atteinte respiratoire est plus importante et qui sont plus lourdement traités (de Vrankrijker *et al.*, 2011).

De nombreuses études ont été réalisées afin de caractériser la colonisation des voies respiratoires causée par les *Aspergillus*. Le génotypage des isolats d'*A. fumigatus* collectés à partir des expectorations de deux patients CF sur une période de deux ans au moyen de deux méthodes (une RAPD et la RFLP suivie de l'hybridation par la sonde Afut1) a suggéré l'existence de différents profils de colonisation : l'un des patients présentant trois génotypes et le second neuf (Verweij *et al.*, 1996). Plus récemment, l'utilisation de l'analyse des microsatellites a permis d'identifier trois profils de colonisation distincts : (i) une colonisation chronique ou continue par un génotype prédominant ; (ii) des colonisations chroniques par plusieurs génotypes détectés simultanément ; et (iii) des colonisations transitoires (Vanhee *et al.*, 2008; de Valk *et al.*, 2009). Cependant, les résultats de certaines études semblent indiquer qu'il existe une sélection génotypique au fur et à mesure que la colonisation se prolonge. En effet, dans ces études, les patients récemment colonisés par ce champignon présentaient plusieurs génotypes, alors que le nombre de génotypes identifiés diminuait avec l'ancienneté de la colonisation (Neuvéglise *et al.*, 1997; Cimon *et al.*, 2001).

De même, la capacité d'*A. terreus* à coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose a été investiguée par typage RAPD, mais l'étude ne portant que sur quatre isolats obtenus à partir de deux patients CF et la méthode étant peu discriminante, aucun profil de colonisation n'avait pu être identifié (Symoens *et al.*, 2000). Tout récemment, une méthode d'analyse des microsatellites spécifiques d'*A. terreus* a été développée en collaboration avec les Pr. Jacques Meis et Corné Klaassen à Nimègue (Pays-Bas). Appliquée au typage de 115 isolats collectés à partir de 45 expectorations de patients CF, cette méthode a établi qu'à la manière d'*A. fumigatus*, *A. terreus* peut être à l'origine de trois profils de colonisation : (i) une colonisation chronique par un génotype largement dominant associé à un ou deux autres rencontrés occasionnellement ; (ii) une colonisation prolongée par deux génotypes distincts détectés simultanément ; et (iii) une colonisation transitoire par des génotypes toujours différents (Rougeron *et al.*, 2013) (Annexe 1). Ces résultats démontrent ainsi l'importance du génotypage des isolats cliniques pour conclure à une colonisation chronique des voies respiratoires des patients CF en cas d'isolement répété de ce champignon. La différenciation entre le portage transitoire de génotypes toujours différents et une colonisation chronique est d'autant plus importante que seul une réelle colonisation chronique contribue à l'entretien de la réaction inflammatoire *in situ* et participe à la détérioration progressive de la fonction pulmonaire. Le typage peut alors aider les cliniciens dans la décision de traiter pour éradiquer le champignon des voies respiratoires et ainsi participer à l'amélioration de la qualité de vie des patients.

L'importance clinique de la colonisation des patients atteints de mucoviscidose par les espèces du genre *Aspergillus* est très variable. En effet, il a été démontré qu'*A. fumigatus* peut être responsable, dans ce contexte, de différentes atteintes incluant l'asthme, la bronchite ou encore l'aspergillome. Mais, la principale manifestation clinique causée par ce champignon filamenteux est l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA). Il est à noter qu'*A. terreus* peut lui aussi être à l'origine de cas d'ABPA (Mortensen *et al.*, 2011). Cette pathologie, dont la prévalence varie de 0,9% à 15% selon les études, est associée à une dégradation de la fonction respiratoire des patients CF (Schønheyder *et al.*, 1988; Wojnarowski *et al.*, 1997; de Vrankrijker *et al.*, 2011). En 2003, une conférence de consensus a redéfini les critères diagnostiques de l'ABPA, une culture positive pour *A. fumigatus* obtenue lors de l'examen mycologique d'une expectoration devenant une aide au diagnostic, mais non plus un critère. En effet, dans cette revue de la littérature, seuls 34% des patients CF américains et 45% des patients CF européens présentant une ABPA avaient des cultures positives pour *A. fumigatus* (Stevens *et al.*, 2003).

Plusieurs études ont porté sur le lien qui pourrait exister entre la colonisation par *A. fumigatus* et la détérioration de la fonction respiratoire en dehors du contexte d'ABPA. Les patients CF colonisés par *A. fumigatus* présentent une capacité respiratoire diminuée, des anomalies radiologiques plus importantes, et sont hospitalisés plus fréquemment que les patients CF non colonisés. Néanmoins, aucune relation de causalité n'a pu être mise en évidence entre cette colonisation et la dégradation de la fonction respiratoire (Speirs *et al.*, 2012).

D'autres espèces du genre *Aspergillus* ont été retrouvées dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose. *Aspergillus flavus*, *A. niger* et *A. nidulans* ont été détectés pour 3,4%, 2,9% et 1,9% des 210 patients CF inclus dans une étude récente (Paugam *et al.*, 2010). Grâce au développement des techniques d'identification moléculaire, quelques cas de colonisation des voies respiratoires par *Aspergillus lentulus* et *Neosartorya pseudofischeri* ont été décrits dans le contexte de la mucoviscidose (Symoens *et al.*, 2010).

#### **b. Espèces du complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum***

Les premiers isollements de *Scedosporium apiospermum* dans le contexte de la mucoviscidose ont été rapportés en 1991, à partir des expectorations de trois patients CF suite à l'éradication d'*A. fumigatus* par l'itraconazole (Chabasse *et al.*, 1991). La prévalence de *S. apiospermum* a ensuite été estimée en France via deux études : l'une transversale incluant 210 patients portant sur l'analyse d'une seule expectoration par patient (Cimon *et al.*, 1995) ; l'autre longitudinale portant sur le suivi de 128 patients pendant cinq ans (Cimon *et al.*, 2000). Ces travaux menés à l'aide de milieux de culture sélectifs ont estimé la prévalence de *S. apiospermum* dans le contexte de la mucoviscidose à 3,3% tout d'abord (Cimon *et al.*, 1995), puis à 8,6% dans un second temps (Cimon *et al.*, 2000). Une étude plus récente réalisée à partir de 657 expectorations collectées auprès de 201 patients CF (Paugam *et al.*, 2010) retrouve une prévalence de 3,4%. Ces variations illustrent la difficulté de mettre en évidence ce champignon filamenteux à croissance relativement lente (5 à 7 jours) à partir des crachats des patients CF, notamment lors de la présence concomitante d'autres champignons à croissance rapide et extensive comme *A. fumigatus*.

Dans d'autres pays, la prévalence de *S. apiospermum* dans le contexte de la mucoviscidose est également très variable. Ainsi, avec des méthodes classiques de culture peu sélectives, sa prévalence chez les patients CF a été estimée à 10% (Williamson *et al.*, 2001), puis plus

récemment à 7,2% (Heath *et al.*, 2009) et 8,7% (Blyth *et al.*, 2010b) en Australie, et à 2% en Italie (Manso *et al.*, 2011). Avec des méthodes de détection spécifiques de *S. apiospermum*, sa prévalence a été estimée à 6,5% en Autriche (Rainer *et al.*, 2007), à 14% en Allemagne (Horré *et al.*, 2009), et à 15,9% ou 17,4% en Australie (Blyth *et al.*, 2010a; Blyth *et al.*, 2010b). Outre l'absence de standardisation de l'examen mycologique des expectorations signalée par Borman *et al.* (2010), des variations dans la distribution géographique de ces champignons pourraient également intervenir dans les variations de fréquence rapportées d'une étude à l'autre. Par ailleurs, la fréquence des différentes classes de mutation du gène *CFTR* varie d'un pays à l'autre et ce paramètre devrait à l'avenir être pris en compte dans ces études de prévalence.

La primocolonisation des voies respiratoires par *S. apiospermum* survient en général à l'adolescence (l'âge moyen lors du premier isolement étant de 14,5 ans), et le plus souvent chez des patients déjà colonisés par *A. fumigatus* (avec un délai de 14 mois en moyenne entre l'installation des deux champignons) (Cimon *et al.*, 2000).

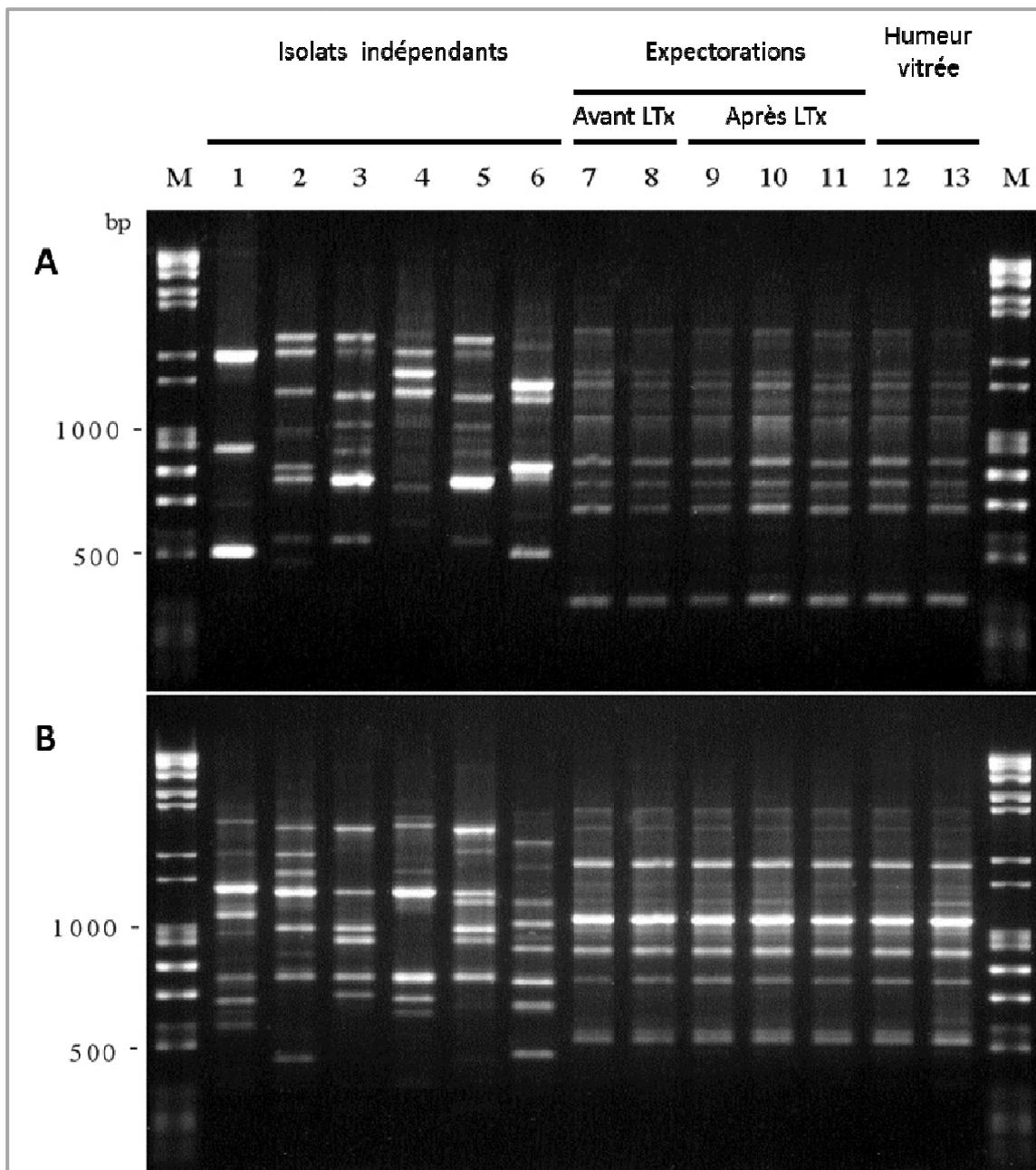
La technique de RAPD développée par Zouhair et ses collaborateurs (Zouhair *et al.*, 2001), a été utilisée pour caractériser la colonisation de patients CF (Defontaine *et al.*, 2002). Dans cette étude incluant les isolats obtenus à partir de neuf patients atteints de mucoviscidose, cinq d'entre eux ne présentaient qu'un génotype. Pour deux de ces patients, le génotype unique perdurait huit et neuf mois. Les quatre autres patients de l'étude présentaient de deux à quatre génotypes responsables des profils de colonisation suivants : (i) une colonisation chronique par un génotype prédominant pendant 1 an associée à la présence occasionnelle d'un ou deux génotypes ; (ii) une colonisation chronique par deux génotypes prédominants retrouvés pendant neuf mois ; (iii) deux génotypes retrouvés successivement (à 15 jours d'intervalle).

L'une des questions régulièrement posée par les cliniciens impliqués dans la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose concerne la signification clinique de la colonisation des voies respiratoires par *S. apiospermum*. Cette colonisation est rarement associée à des signes cliniques (Defontaine *et al.*, 2002; Pihet *et al.*, 2009). Toutefois, elle ne peut être négligée puisqu'elle participe probablement à l'entretien de la réaction inflammatoire par la sécrétion de protéases et le relargage de polysaccharides et contribue alors à la détérioration progressive de la fonction pulmonaire (Pihet *et al.*, 2009). De plus, il a été démontré que *S. apiospermum* peut être à l'origine de mycoses broncho-pulmonaires allergiques (ABPM) semblables aux ABPA (Cimon *et al.*, 2000). La colonisation des voies

respiratoires par *S. apiospermum* des patients CF constitue également un risque de dissémination hémotogène en cas de déficit immunitaire. Un cas de spondylodiscite multifocale à *S. apiospermum* a été décrit pour un patient colonisé par ce champignon sans qu'il ne présente de symptômes pulmonaires. La malnutrition et le diabète cortico-induit que présentait ce patient ont permis la dissémination extra-pulmonaire du champignon (Guignard *et al.*, 2008). L'immunosuppression instaurée suite à une transplantation de poumons peut aussi constituer un facteur de risque de dissémination de *S. apiospermum* pour des patients CF colonisés. Ce phénomène semble rare puisque seuls cinq cas ont été inventoriés entre 1996 et 2012 (Morin *et al.*, 1999; Symoens *et al.*, 2006; Borghi *et al.*, 2010; Morio *et al.*, 2010; Hirschi *et al.*, 2012). Mais, *S. apiospermum* étant peu sensible aux antifongiques actuellement disponibles et pouvant disséminer à d'autres organes dont le greffon, une colonisation chronique pourrait constituer une contre-indication à la transplantation pulmonaire. Symoens et ses collaborateurs (2006) ont d'ailleurs démontré chez une patiente colonisée depuis plusieurs années par *S. apiospermum* et ayant développé une scédosporiose disséminée fatale avec atteintes cutanées, oculaires et cérébrales après transplantation bipulmonaire qu'un même génotype était à l'origine des lésions oculaires survenues après la transplantation et de la colonisation des voies respiratoires avant transplantation (Figure 13).

### c. Autres espèces

D'autres espèces, plus récemment décrites, ont aussi été retrouvées dans les expectorations des patients CF. Néanmoins, l'estimation de la prévalence des champignons filamenteux dans le contexte de la mucoviscidose est très variable d'un centre à l'autre et largement tributaire du fait qu'il n'existe pas de méthode standardisée pour l'examen mycologique des crachats de ces patients (Borman *et al.*, 2010).



**Figure 13 : Profils RAPD de souches de *S. apiospermum* obtenus avec les amorces UBC 701 (A) et UBC 703 (B) dans le cas clinique publié par Symoens *et al.* (2006).**

Des profils RAPD différents sont obtenus pour les isolats indépendants (1-6). Un même génotype est identifié à partir des expectorations collectées 2 ans et 2 jours avant la transplantation pulmonaire (7 et 8) ou dans les jours qui ont suivi la transplantation (9-11), comme à partir de l'humeur vitrée (12 et 13).

LTX : transplantation pulmonaire

➤ ***Scedosporium prolificans***

*Scedosporium prolificans* (anciennement *Scedosporium inflatum* ou *Lomentospora prolificans*) est un champignon filamenteux de l'ordre des Microascales n'appartenant pas au complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. Une revue des cas de scédosporioses causées par *S. prolificans* publiée en 2009 recense 19 patients atteints de mucoviscidose présentant une colonisation transitoire ou persistante des poumons par ce champignon (Rodriguez-Tudela *et al.*, 2009), la majorité étant originaire de pays chauds comme l'Espagne et l'Australie (López *et al.*, 2001; Blyth *et al.*, 2010a; Lackner *et al.*, 2011). Différentes études rapportent des cas de colonisation chronique perdurant jusqu'à quatre ans (Tintelnot *et al.*, 2009; Lackner *et al.*, 2011). *Scedosporium prolificans* est résistant à de nombreux traitements antifongiques, comme l'amphotéricine B et les azolés (itraconazole, posaconazole et voriconazole). Seules les échinocandines (caspofungine, micafungine et anidulafungine) présentent une activité contre ce champignon, mais elle reste modérée (Lackner *et al.*, 2012). La mortalité associée aux scédosporioses à *S. prolificans* est très importante notamment lors d'infections invasives déclarées lors de cancers hématologiques. Dans le contexte de la mucoviscidose, *S. prolificans* semble être un simple colonisateur, et non un véritable pathogène. Toutefois, la détection de ce champignon multirésistant dans les crachats des patients CF ne pourra être négligée.

➤ ***Exophiala dermatitidis***

*Exophiala dermatitidis* est un phaeohyphomycète (ou dématié) qui se présente sous forme d'une levure noire à 37°C, mais sous forme filamenteuse à 25°C. Les principales descriptions d'*E. dermatitidis* dans le contexte de la mucoviscidose ont été réalisées en Allemagne et aux Pays-Bas grâce au développement d'un milieu de culture sélectif (Erythritol - Chloramphénicol Agar, ECA). Dans ces pays, sa prévalence varie de 1,8% à 15,7% (Horré *et al.*, 2004; Pihet *et al.*, 2009). Plus récemment, la prévalence d'*E. dermatitidis* a été estimée en Belgique et en Suède à 5,8% et 19%, respectivement (Lebecque *et al.*, 2010; Kondori *et al.*, 2011). La colonisation des voies aériennes par *A. fumigatus* et l'homozygotie F508del seraient des facteurs de prédisposition à la colonisation des patients CF par *E. dermatitidis* (Lebecque *et al.*, 2010). Au cours du typage de 71 isolats obtenus à partir de 13 patients CF par une technique de RAPD utilisant deux amorces (BG-2 et ERIC-1), les isolats se sont retrouvés regroupés dans des clusters patient-spécifiques. Ces résultats ont ainsi révélé qu'*E. dermatitidis* est responsable d'une colonisation des voies aériennes typique d'un

champignon présent dans l'environnement, non pas de manière homogène, mais dans des réservoirs particuliers (Packeu *et al.*, 2012). Des travaux récents montrent que ce champignon initialement rapporté dans les saunas et hammams au Japon et en Europe (Nishimura and Miyaji, 1982; Matos *et al.*, 2002), est très fréquent dans l'environnement intérieur. Il colonise les salles de bain et les cuisines où on le retrouve sur les joints des baignoires et cabines de douche, comme dans le siphon d'évacuation de l'eau des baignoires et des éviers (Hamada and Abe, 2010). Mais surtout, deux publications récentes font état de sa fréquence très élevée (près de 60%) sur les joints des lave-vaisselle (Zalar *et al.*, 2011; Döğen *et al.*, 2013).

➤ ***Acrophialophora fuispora***

*Acrophialophora fuispora* est un hyalohyphomycète tellurique rarement retrouvé en pathologie humaine. Toutefois, dans le contexte de la mucoviscidose, quelques cas de portage transitoire (3 patients) et de colonisation chronique (2 patients) ont été rapportés au début des années 2000 (González-Escalada *et al.*, 2000; Cimon *et al.*, 2005). Si les isollements d'*A. fuispora* chez des patients CF paraissent anecdotiques, sa prévalence est indéniablement sous-estimée. En effet, ce champignon pathogène reste peu connu à ce jour, même par les laboratoires de mycologie médicale. Ses caractéristiques microscopiques peuvent porter à confusion avec d'autres champignons filamenteux plus courants, tels que *Scedosporium prolificans*, *Scopulariopsis chartarum* et les espèces du genre *Paecilomyces* (Pihet *et al.*, 2009).

➤ ***Rasamsonia argillacea***

*Rasamsonia argillacea* (anciennement *Geosmithia argillacea*) est un complexe d'espèces récemment décrit (Houbraken *et al.*, 2012) capable de coloniser les voies respiratoires des patients CF (Barton *et al.*, 2010; Giraud *et al.*, 2010). Sa prévalence dans le contexte de la mucoviscidose est assurément sous-estimée puisque ses caractéristiques microscopiques sont proches de celles des *Penicillium* et *Paecilomyces*. De nombreux cas d'identification erronée ont été répertoriés dans ce sens (Cimon *et al.*, 1999; Giraud *et al.*, 2010; Houbraken *et al.*, 2013). La colonisation des patients CF par les espèces de ce complexe ne semble pas corrélée à une exacerbation de la maladie pulmonaire. Toutefois, la colonisation des voies respiratoires par ces champignons qui peuvent être responsables de mycoses invasives (De

Ravin *et al.*, 2011), et présentent une résistance quasi-constante au voriconazole, ne peut être négligée pour les patients pour lesquels une transplantation pulmonaire est envisagée (Houbraken *et al.*, 2013). Par ailleurs, une publication récente fait état d'une véritable infection respiratoire déterminée par l'un de ces champignons (Marguet *et al.*, 2012).

➤ ***Pneumocystis jirovecii***

*Pneumocystis jirovecii* (anciennement *Pneumocystis carinii*), micro-organisme récemment rattaché au règne des Fungi, est un champignon atypique retrouvé à l'état parasitaire chez l'homme et capable de coloniser les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose. Ce micro-organisme n'étant pas cultivable, son identification se fait à l'examen direct du liquide de lavage broncho-alvéolaire par des techniques de colorations spécifiques ou d'immunofluorescence. L'estimation de sa prévalence dans la mucoviscidose nécessite donc l'utilisation d'une méthode de détection moléculaire (amplification par « nested-PCR ») à partir des expectorations des patients. Ainsi, quelques études ont établi que la prévalence de *P. jirovecii* varie selon les pays : 7,4% en Allemagne (Sing *et al.*, 2001), 21,5% en Espagne (Respaldiza *et al.*, 2005) et 38,2% au Brésil (Pederiva *et al.*, 2012). En France, des résultats contradictoires ont été rapportés par Le Gal *et al.* (2010) et Hernández-Hernández *et al.* (2012) : une faible prévalence (1,3%) a été obtenue lors de l'analyse de 146 expectorations collectées à partir de 76 patients CF suivis à Brest (LeGal *et al.*, 2010). Inversement, une étude multicentrique incluant 104 patients CF suivis à Angers, à Bordeaux, à Dunkerque et à Lille a rapporté une fréquence de *P. jirovecii* dans la mucoviscidose de 12,5% (Hernández-Hernández *et al.*, 2012).

## 2. Complexe d'espèces *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum*

### 2.1. Morphologie

#### 2.1.1. Aspect macroscopique

Sur milieu de culture YPDA (Yeast extract - Peptone - Dextrose Agar), *S. apiospermum* qui tolère des températures d'incubation pouvant atteindre 42°C, présente une croissance assez lente (environ 7 jours) à 37°C. À maturité, les colonies ont un aspect cotonneux, laineux. Elles sont blanches au début et deviennent grises en vieillissant. Le verso est gris foncé à noir (Figure 14) (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008).

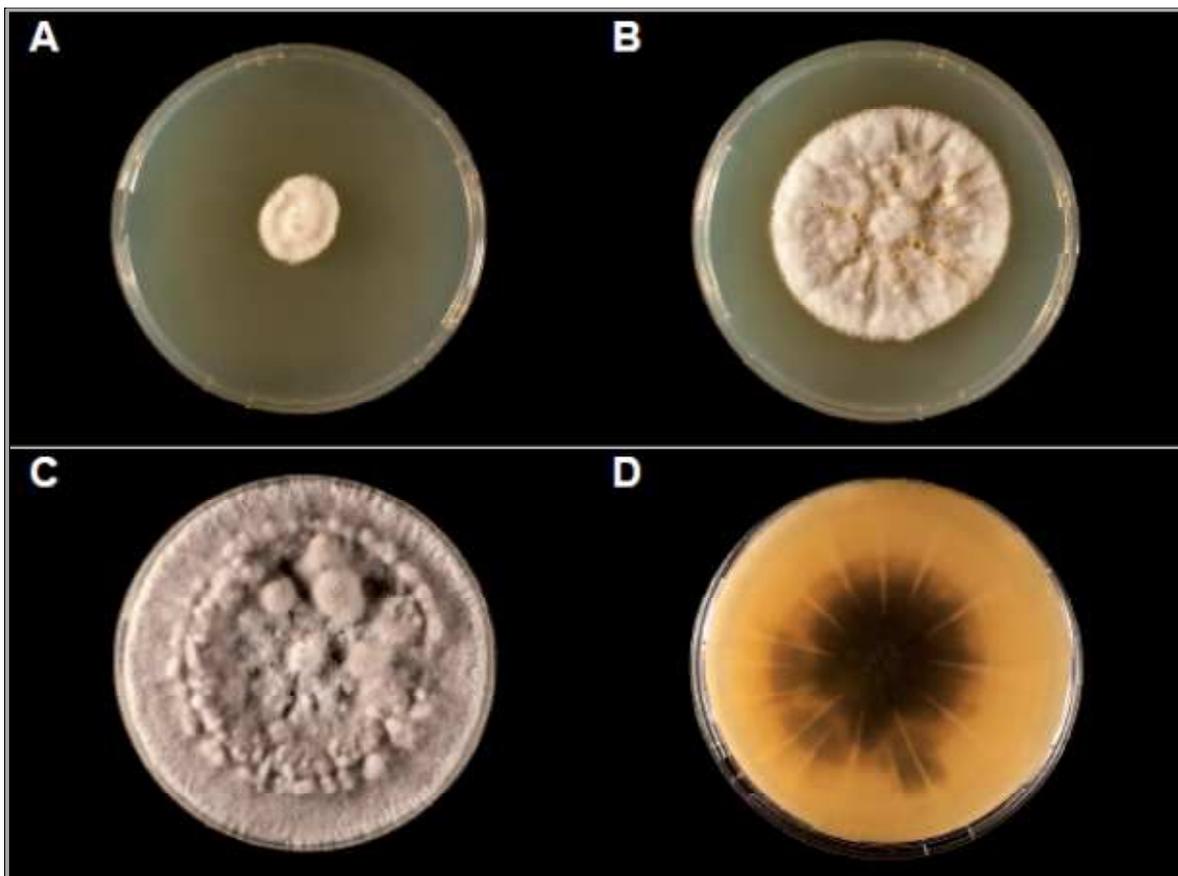


Figure 14 : Colonies de *S. apiospermum* à J3 (A), J7 (B) et J14 (C) cultivé sur milieu YPDA incubé à 37°C. Le verso est gris foncé à noir (D).

## 2.1.2. Aspect microscopique

### a. Téléomorphe

La forme sexuée *Pseudallescheria* est caractérisée par des cléistothèces jaunes à bruns, sphériques, de 140 à 180  $\mu\text{m}$  de diamètre, à paroi fine composée de cellules polygonales. À maturité, ces organes clos se déchirent pour libérer des asques sphériques octosporés présentant une paroi si fine que les ascospores sont rapidement libérées à leur tour. Ces dernières sont unicellulaires, ovoïdes à ellipsoïdales et lisses. Elles sont jaune pâle à brun cuivre et mesurent de 4 à 5  $\mu\text{m}$  de large sur 7 à 9  $\mu\text{m}$  de long (Figure 15) (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008).

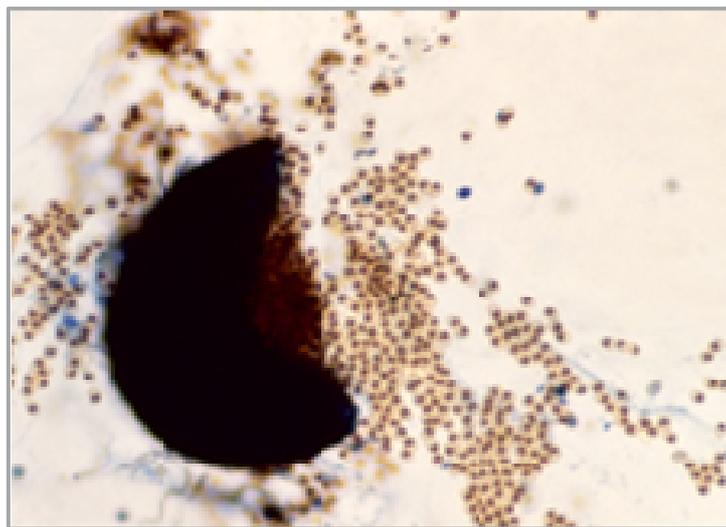


Figure 15 : Cléistothèce et ascospores de la forme sexuée *Pseudallescheria* (objectif x100).

### b. Anamorphe

Deux modalités de reproduction asexuée ont été identifiées. La forme *Scedosporium* est caractérisée par des cellules conidiogènes émanant de filaments végétatifs septés et hyalins. Les spores naissent à l'extrémité de courts conidiophores dressés à angle aigu sur le thalle végétatif, ou pour certaines à l'extrémité des filaments végétatifs, voire directement sur les côtés des filaments végétatifs. Les conidies sont ovoïdes ou claviformes, brunes et mesurent 5 à 6  $\mu\text{m}$  de large sur 6 à 14  $\mu\text{m}$  de long (Figure 16) (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008).



Figure 16 : Conidies brunes, ovoïdes ou claviformes de la forme *Scedosporium* (objectif x40).

Le stade *Graphium* est quant à lui caractérisé par une conidiogénèse faisant intervenir des annellides groupées en corémies. Ces structures consistent en un regroupement de plusieurs conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres et terminés à leur sommet par les cellules conidiogènes de type annelide. Les conidies formées sont allongées, hyalines et plus minces puisqu'elles mesurent de 2 à 3  $\mu\text{m}$  de large sur 5 à 7  $\mu\text{m}$  de long (Figure 17) (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008).

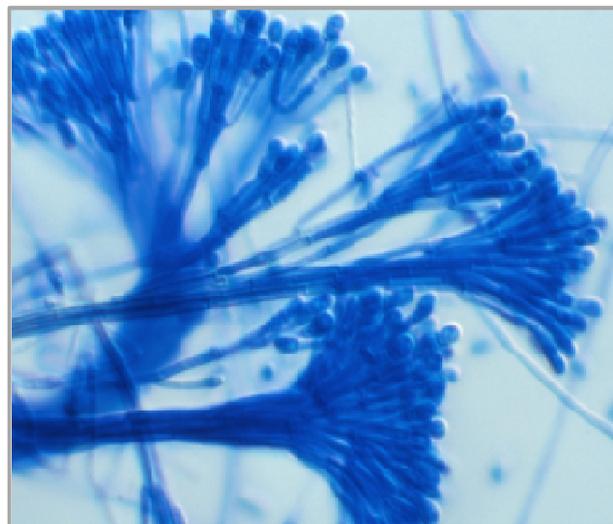


Figure 17 : Corémies caractéristiques du stade *Graphium* (objectif x40).

Après une conservation longue et de nombreux repiquages sur milieu gélosé, certaines cultures peuvent occasionnellement dégénérer et perdre leur capacité de sporulation. Les

colonies sont alors moins cotonneuses et deviennent blanchâtres. Dans ce cas, les cellules des hyphes peuvent gonfler et se désarticuler à la manière d'arthroconidies (Guarro *et al.*, 2006). Ce stade dénommé *Polycytella hominis* a été décrit à partir d'une souche isolée d'un mycétome à grains blancs, produisant des conidies allongées multiseptées (Campbell, 1987). Ce n'est que bien plus tard, en 2006, que des analyses moléculaires et des tests de sensibilité aux antifongiques ont démontré que *P. hominis* était un mutant de *S. apiospermum* (Borman *et al.*, 2006).

## 2.2. Taxonomie

### 2.2.1. Historique

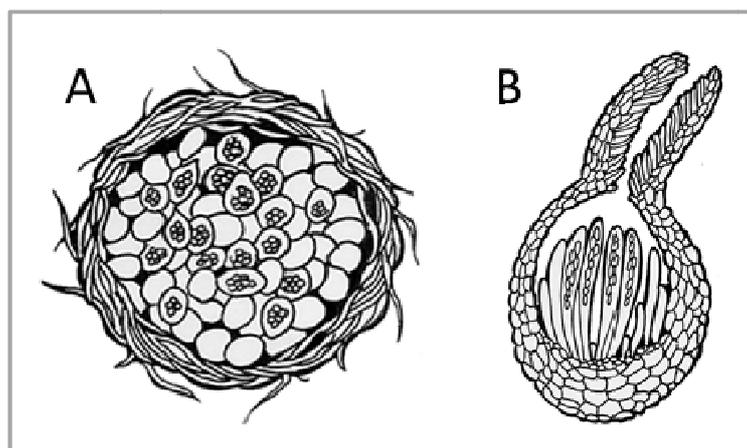
En 1893, Costantin a décrit l'espèce *Eurotiopsis gayoni* Cost., mais cette dénomination avait déjà été utilisée au sein de l'ordre des Sphaeropsidales. C'est pourquoi en 1899, Saccardo et Sidow ont remplacé *Eurotiopsis* par *Allescheria*, *E. gayoni* est ainsi devenu *Allescheria gayoni*. Shear a défini *Allescheria boydii* en 1922 à partir d'une souche isolée d'un mycétome à grains blancs, et Negroni et Fischer ont décrit, en 1944, *Pseudallescheria shearii* comme étant un ascomycète produisant des cléistothèces. En 1970, Malloch a étudié la famille des Microascacées (ordre des Microascales). Tenant compte des descriptions de Costantin et de Shear, il a conclu que *A. gayoni* appartenait au genre *Monascus* et *A. boydii* au genre *Petriellidium*, genre dont les espèces produisent des cléistothèces et proche du genre *Petriella* (dont les espèces donnent des périthèces). Ce n'est qu'en 1982 que, après avoir comparé *Petriellidium* Malloch et *Pseudallescheria* Negroni & Fischer, McGinnis et Coll. ont conclu que ces deux dénominations correspondaient au même champignon, la dénomination *Pseudallescheria boydii* apparaissant alors comme la plus adaptée. Les sept espèces de *Petriellidium* ont donc été reclassées dans le genre *Pseudallescheria* (*P. boydii*, *P. africana*, *P. angusta*, *P. desertorum*, *P. ellipsoidea*, *P. fimeti* et *P. fusoidea*) (Cortez *et al.*, 2008).

Parallèlement, en 1911, Saccardo a décrit *Monosporium apiospermum* à partir d'une souche isolée d'un mycétome à grains blancs, champignon qui a été renommé *Scedosporium apiospermum* par Castelli et Chalmers en 1919, et en 1944, Emmons a établi que *S. apiospermum* était l'anamorphe de *P. boydii* puisqu'ils présentaient une morphologie semblable et étaient responsables de la même symptomatologie (Cortez *et al.*, 2008).

En 1984, Malloch a décrit une nouvelle espèce de *Scedosporium*, *S. inflatum*, isolée d'un cas d'ostéomyélite. En 1991, sur la base de caractéristiques morphologiques et moléculaires, Gueho et de Hoog ont suggéré que *S. inflatum* et *Lomentospora prolificans* sont en réalité des synonymes, et ont proposé la dénomination *Scedosporium prolificans*. Cette hypothèse a été confirmée en 1994 par l'analyse des régions ITS (pour *Internal Transcribed Spacer*) 1 et 2 des ADN ribosomiaux de souches de *S. inflatum*, *L. prolificans*, *S. apiospermum* et *P. boydii*, ce travail insistant aussi sur la distinction des espèces *S. prolificans* et *S. apiospermum* / *P. boydii* (Lennon *et al.*, 1994).

### 2.2.2. Phylogénie actuelle

*Scedosporium apiospermum* est un champignon filamenteux appartenant à l'embranchement des Ascomycètes, le sous-embranchement des Euascomycètes, la classe des Sordariomycètes et l'ordre des Microascales, ce dernier regroupant des germes potentiellement responsables de pathologie humaine comme *Scopulariopsis* et *Microascus*. *Scedosporium apiospermum* appartient à la famille des Microascacées caractérisée par la production de deux types d'ascocarpes : (i) les cléistothèces, ascocarpes clos qui se déchirent à maturité pour libérer les ascospores, et (ii) les périthèces, ascocarpes munis d'un ostiole permettant la libération des ascospores (Figure 18).



**Figure 18 : Ascocarpes des Microascacées.**

A : Cléistothèce, ascocarpe clos qui se déchire à maturité pour libérer les ascospores ; B : Périthèce, ascocarpe en forme de bouteille.

Parmi les champignons filamenteux de la famille des Microascacées, seul un nombre limité d'espèces a été décrit dans des infections humaines. Au sein de cette famille, trois groupes ont été différenciés, *Pseudallescheria*, *Petriella* et *S. prolificans*, dans une large étude de taxonomie basée sur les séquences nucléotidiques des régions ITS et sur les caractéristiques morphologiques et culturales d'un total de 71 souches cliniques ou environnementales (Rainer and de Hoog, 2006). Alors que *S. prolificans* semble être une espèce homogène, deux sous-groupes apparaissent au sein du genre *Petriella* (*Pe.*), l'un constitué des espèces *Pe. sordida* et *Pe. guttulata* et l'autre de *Pe. setifera* principalement. De même au sein de *Pseudallescheria*, quatre sous-groupes se différencient, l'un correspondant à *P. africana*, un autre à *P. desertorum* et les deux derniers à *P. boydii*.

Au cours des années 1990, une grande variabilité génétique a été observée pour *P. boydii* et les espèces apparentées dans de nombreuses études de phylogénie (Guého and de Hoog, 1991; de Hoog *et al.*, 1994; Issakainen *et al.*, 1997; Rainer *et al.*, 2000). En 2005 et 2008, deux larges études de taxonomie menées sur 60, puis 141, souches cliniques ou environnementales ont établi que *P. boydii* est un complexe d'espèces (Gilgado *et al.*, 2005). Ces travaux comportaient la description des morphologies macroscopique et microscopique, des tests de croissance à différentes températures d'incubation (25, 37, 40, 42, 45 et 50°C) et des tests d'assimilation de sucres (ribitol, L-arabinitol, sucrose, maltose et D-ribose) (Tableau 2). De plus, les séquences nucléotidiques de deux régions du gène codant la  $\beta$ -tubuline (TUB et BT2), d'une partie du gène codant la calmoduline (CAL) et d'une portion du génome constituée des régions ITS 1 et 2 et de la sous-unité 5,8S des ARN ribosomiaux (ITS) ont été analysées (Figure 19). L'ensemble des résultats a permis d'élever au rang d'espèces *Scedosporium aurantiacum*, *Pseudallescheria minutispora* et *Scedosporium dehoogii* et de clairement différencier *S. apiospermum* et *P. boydii* en deux espèces distinctes (Gilgado *et al.*, 2005; Gilgado *et al.*, 2008). Quant à la subdivision de cette dernière espèce en *Pseudallescheria ellipsoidea*, *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria fusoidea* et *P. boydii sensu stricto*, elle reste sujette à débat aujourd'hui (Rainer *et al.*, 2000; Gilgado *et al.*, 2005).

**Tableau 2 : Caractéristiques morphologiques et physiologiques des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* et de *S. prolificans*, d'après Gilgado *et al.* (2008).**

Espèces	Cellules conidiogènes	Aleurie	Assimilation du :					Croissance à :	
			Ribitol	L-Arabinitol	Sucrose	Maltose	D-Ribose	40°C	45°C
<i>P. boydii</i> et espèces apparentées	Cylindrique	Globuleuse à subglobuleuse, à paroi épaisse	+	+	+	+	+	+	-
<i>P. minutispora</i>	Cylindrique	Ellipsoïdeale à ovoïde, à paroi mince	+	+	+	-	-	+	-
<i>S. apiospermum</i>	Cylindrique	Globuleuse à subglobuleuse, à paroi épaisse	+	+	+	+	-	+	-
<i>S. aurantiacum</i>	Cylindrique ou en forme de bouteille	Ovoïde, à paroi épaisse	+	+	-	+	+	+	+
<i>S. dehoogii</i>	Cylindrique ou en forme de bouteille	Ovoïde, à paroi mince	+	+	+	+	-	-	-
<i>S. prolificans</i>	En forme de bouteille	Globuleuse à subglobuleuse, à paroi épaisse	-	-	-	+	-	+	V

La nomenclature des états sexués et asexués pour le complexe d'espèces *S. apiospermum* / *P. boydii* est présentée dans le tableau 3 ci-dessous, où les signes « + » et « - » correspondent à la présence ou l'absence habituelle de la forme *Graphium* lors d'une observation microscopique (Gilgado *et al.*, 2010).

**Tableau 3 : Nomenclature des états sexués et asexués des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*.**

Téléomorphe	Anamorphe	Stade <i>Graphium</i>
Inconnu	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	+
<i>Pseudallescheria minutispora</i>	<i>Scedosporium minutispora</i>	+
Inconnu	<i>Scedosporium dehoogii</i>	-
<i>Pseudallescheria apiosperma</i>	<i>Scedosporium apiospermum</i>	+
<i>Pseudallescheria boydii</i>	<i>Scedosporium boydii</i>	+



## 2.3. Pathogénicité

*Scedosporium apiospermum* est un pathogène opportuniste. Les manifestations cliniques des scédosporioses sont largement tributaires de la porte d'entrée du champignon et du statut immunitaire de l'hôte. Trois grands types de syndromes peuvent être distingués : (i) les infections localisées faisant suite à une inoculation traumatique ; (ii) les colonisations des cavités naturelles comme les poumons ; et (iii) les infections systémiques invasives.

### 2.3.1. Infections localisées après un traumatisme

Les infections localisées faisant suite à un traumatisme surviennent principalement chez des personnes immunocompétentes en bonne santé. Lorsque ces infections surviennent chez des patients immunodéficients, elles vont plus facilement disséminer et provoquer une scédosporiose invasive. Les principales formes localisées sont les mycétomes, les arthrites et ostéomyélites et les infections oculaires.

#### a. Mycétomes

Un mycétome est une infection chronique des tissus cutanés et sous-cutanés, pouvant s'étendre aux structures environnantes comme les articulations, les os et les fascias. Cette affection n'est pas douloureuse et évolue en taille sur plusieurs années. Certains auteurs suggèrent qu'une substance responsable d'une anesthésie locale pourrait être sécrétée par le mycétome, ce qui faciliterait sa diffusion aux tissus adjacents sans provoquer de douleur (Jimenez and Salvo, 2011).

L'origine de cette affection est l'inoculation traumatique de germes exogènes présents dans l'environnement, consistant en un franchissement cutané (blessures par perforation avec des épines ou des échardes de bois), une abrasion, ou encore un contact avec des objets pointus comme des outils agricoles (Cortez *et al.*, 2008; Jimenez and Salvo, 2011).

Deux types de mycétomes se distinguent par leur étiologie : (i) les actinomycétomes sont provoqués par des bactéries et représentent 60% des cas de mycétomes, la bactérie la plus couramment rencontrée étant *Nocardia brasiliensis* ; (ii) les eumycétomes déclenchés par des champignons filamenteux, *Madurella mycetomatis* étant responsable de 70% des cas et *S. apiospermum* de 10% (Cortez *et al.*, 2008; Jimenez and Salvo, 2011). Il est à noter qu'en Europe et aux Etats-Unis, *S. apiospermum* est le champignon filamenteux le plus fréquent

dans les eumycétomes et le seul pouvant être acquis dans ces pays, tous les autres champignons filamenteux rencontrés dans ce contexte résultant de mycoses d'importation (Guarro *et al.*, 2006).

Ces infections se caractérisent par la présence de nodules granulomateux, d'une nécrose locale, d'une tuméfaction et de multiples canaux déversant un liquide visqueux et purulent contenant des grains. Ces derniers correspondent à du mycélium compact (en sclérote) et diffèrent en couleur et en morphologie selon les germes incriminés (Jimenez and Salvo, 2011). Dans le cas des eumycétomes à *S. apiospermum*, les grains sont gros, lobés et blancs (Guarro *et al.*, 2006).

La taille de l'inoculum, le statut immunitaire du patient et la présence d'hormones sexuelles semblent influencer l'apparition et la progression du mycétome. Ainsi, les mycétomes sont plus agressifs au cours d'une grossesse par exemple. Cependant, ce sont les hommes qui sont les plus touchés par rapport aux femmes. Ceci est très certainement lié au fait que les hommes ont plus d'activités en extérieur. Ainsi, les mycétomes au niveau des pieds représentent 70 à 80% des cas, avec 36% des cas au niveau de l'avant du pied (Jimenez and Salvo, 2011).

Le traitement d'un eumycétome consiste en l'ablation chirurgicale de la masse, voire le drainage du pus, et la prise d'antifongiques comme l'itraconazole par exemple, qui s'avère efficace et bien toléré (Jimenez and Salvo, 2011).

### **b. Arthrites et ostéomyélites**

Suite à une inoculation traumatique ou une intervention chirurgicale, *S. apiospermum* peut atteindre les articulations et provoquer une arthrite au niveau des genoux ou des coudes notamment (Guarro *et al.*, 2006). De même, lors d'une blessure perforante profonde, une infection sous-cutanée peut évoluer vers une destruction locale du tissu osseux avoisinant, c'est l'ostéomyélite (Cortez *et al.*, 2008). Ces infections surviennent plusieurs mois, voire plusieurs années après le traumatisme. Contrairement aux eumycétomes, des filaments hyalins sont observés plutôt que des grains. Cependant, les cultures réalisées à partir du liquide articulaire peuvent s'avérer négatives ce qui rend le diagnostic difficile (Guarro *et al.*, 2006).

### c. Infections oculaires

Suite à l'intrusion d'un corps étranger dans l'œil ou à une chirurgie oculaire, des patients immunocompétents peuvent contracter une scédosporiose oculaire. Les symptômes rencontrés sont notamment une ulcération douloureuse et purulente de la cornée, une diminution de l'acuité visuelle, une sécrétion anormale de larmes, une rougeur et une photophobie (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008). Les scédosporioses oculaires sont très diverses et incluent des kératites, des rétinites, des endophtalmies et des infections de l'orbite.

Des cas d'infections oculaires secondaires à une dissémination hémotogène chez des individus fortement immunodéprimés sont aussi rapportés (Guarro *et al.*, 2006).

### 2.3.2. Colonisation des poumons

La colonisation des poumons par *S. apiospermum* affecte principalement les patients ayant un tractus respiratoire altéré comme ceux présentant des bronchectasies, une bronchopneumopathie chronique obstructive, une mucoviscidose (page 33), une sarcoïdose, une tuberculose, ou toute autre infection fongique ou bactérienne provoquant la formation de kystes ou de cavités (Cortez *et al.*, 2008). La contamination se fait alors par inhalation de spores de *S. apiospermum* qui ne peuvent pas être éliminées par la clairance muco-ciliaire ou les macrophages alvéolaires. En germant, elles donnent naissance à des hyphes qui envahissent le tractus respiratoire inférieur.

#### a. Boules fongiques pulmonaires

Les hyphes de *S. apiospermum* se développant dans le tractus respiratoire inférieur peuvent constituer des masses fongiques, à la manière des *Aspergillus* formant des aspergillomes pulmonaires. Ces masses fongiques sont retrouvées dans la littérature sous différents termes « fungus balls », « mycetoma », « non-*Aspergillus* aspergilloma » ou encore « pseudallescherioma », le terme le plus approprié serait alors une colonisation pulmonaire intracavitaire (Severo *et al.*, 2004).

Ces masses fongiques se logent dans des cavités préexistantes ou des bronches dilatées. Elles sont constituées de filaments libres ou d'agglomérats d'hyphes entrelacés mélangés à du mucus bronchique et des débris cellulaires. Ces boules fongiques deviennent tellement

grosses qu'elles sont visibles lors d'une radiographie pulmonaire (Guarro *et al.*, 2006). A l'examen microscopique, des conidies cylindriques sont observées dans la profondeur des boules fongiques, alors qu'en périphérie, des chlamydospores à paroi épaisse sont retrouvées, ceci serait lié au fait qu'elles sont en contact avec l'air contenu dans les poumons (Severo *et al.*, 2004). Les hyphes sont disposés en cercles concentriques correspondant aux vagues de croissance du champignon et semblent émaner du centre de la boule fongique (Guarro *et al.*, 2006).

Les cultures réalisées à partir de ces boules fongiques sont rarement positives pour *S. apiospermum*. Cependant, certains cas ont pu être diagnostiqués par la recherche de précipitines sériques (Severo *et al.*, 2004; Guarro *et al.*, 2006). Une analyse histopathologique peut aussi confirmer le diagnostic par la mise en évidence de filaments hyalins septés entremêlés (Severo *et al.*, 2004).

Le traitement le plus efficace consiste en l'exérèse de la boule fongique (Severo *et al.*, 2004).

#### **b. Scédosporioses broncho-pulmonaires allergiques**

Entre les années 70 et les années 90, de nombreux auteurs ont décrit des cas où la symptomatologie évoquait des aspergilloses broncho-pulmonaires allergiques (ABPA), mais pour lesquels d'autres germes qu'*A. fumigatus* étaient impliqués, notamment d'autres espèces du genre *Aspergillus*, *C. albicans*, des *Mucor* ou encore des *Penicillium* (Miller *et al.*, 1993). Les premiers cas de scédosporioses broncho-pulmonaires allergiques ont été rapportés en 1976 (Rippon and Carmichael, 1976) et sont restés anecdotiques jusqu'au début des années 90 où d'autres auteurs ont fait état de cas de mycoses broncho-pulmonaires allergiques (ABPM) ayant pour agent étiologique *S. apiospermum* (Lake *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1993). Plus récemment, dans le cadre d'une étude prospective portant sur l'épidémiologie de la colonisation par *S. apiospermum* des patients atteints de mucoviscidose, deux cas de mycoses broncho-pulmonaires allergiques provoquées par ce champignon ont été rapportés (Cimon *et al.*, 2000).

### 2.3.3. Infections systémiques invasives

Les scédosporioses disséminées surviennent principalement chez des patients immunodéficients, ou lors de cas d'inoculation massive comme chez les victimes de presque-noyades.

En 2003, une conférence de consensus a permis d'uniformiser le vocabulaire utilisé dans les cas de noyades (*drowning*) et de presque-noyades (*near-drowning*). Il a été proposé de ne conserver que le terme « *drowning* » correspondant alors à un processus d'insuffisance respiratoire primaire causé par l'immersion de la victime dans un milieu liquide, que cette dernière survive ou non à cet incident (Idris *et al.*, 2003). Or le terme français « noyade » implique au sens strict un décès. C'est pourquoi nous conserverons ici le terme « presque-noyade » correspondant à une situation où la victime d'une suffocation par immersion dans un liquide survit, même de manière temporaire (Buzina *et al.*, 2006).

#### a. Scédosporioses pulmonaires invasives

138 cas de scédosporioses pulmonaires invasives diagnostiqués entre 1955 et la fin de l'année 2010 ont été répertoriés dans une revue récente (Kantarcioglu *et al.*, 2012). Ces infections se manifestaient principalement par des pneumonies (94/138 cas, 68%), et survenaient lors de situations particulières telles que la prise de traitements corticostéroïdes (32/138 cas, 23%) ou à la suite d'une transplantation d'organes (19/138 cas, 13,8%). Les scédosporioses pulmonaires invasives se caractérisent par la présence d'infarctus hémorragiques au niveau du parenchyme pulmonaire provoqués par l'envahissement des vaisseaux de petit et moyen calibre par le champignon. Des thromboses peuvent survenir dans les artérioles et d'autres organes peuvent être atteints par dissémination hématogène. La mortalité des scédosporioses pulmonaires invasives, très importante, a été estimée à 57,2% (Figure 20) (Kantarcioglu *et al.*, 2012).

De nombreux cas de pneumonies à *S. apiospermum* survenant chez des patients immunocompétents sont associés à un phénomène de presque-noyade (11,2%) (Kantarcioglu *et al.*, 2012). Les pneumonies secondaires à une presque-noyade présentent un taux de mortalité de 60%. De nombreuses bactéries peuvent être à l'origine de ces pneumonies comme les espèces du genre *Aeromonas* ou *Burkholderia pseudomallei*. *Scedosporium apiospermum* est au premier rang des champignons filamenteux impliqués, suivi des espèces du genre *Aspergillus*.

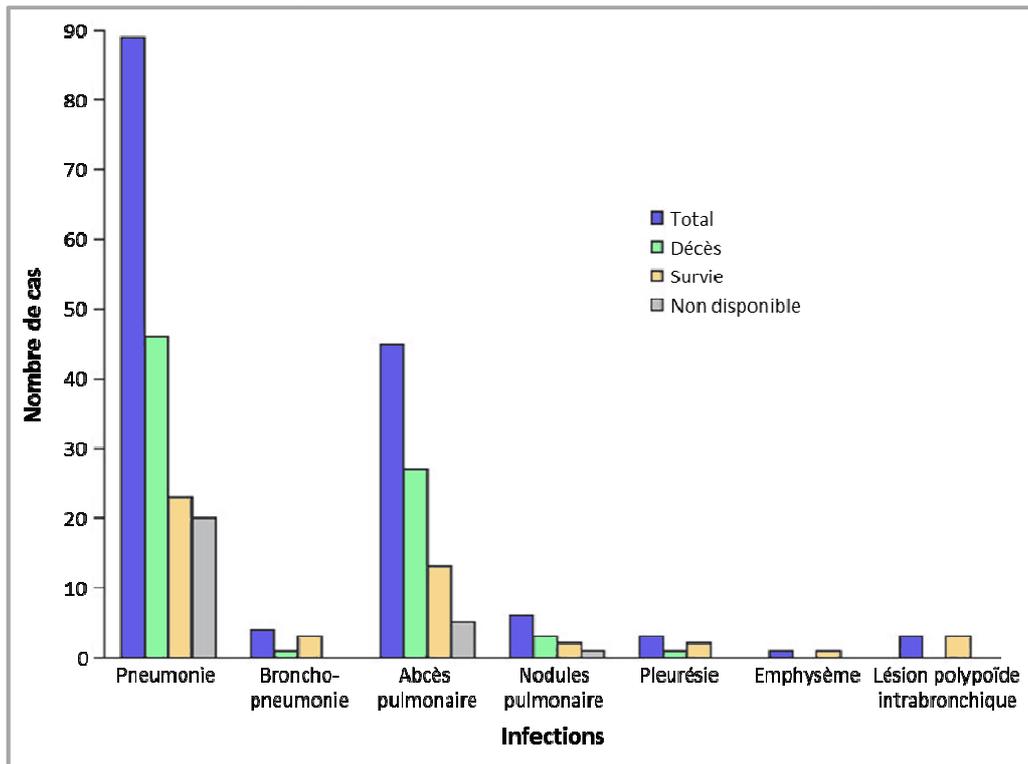


Figure 20 : Taux de mortalité observés pour 138 cas de scédosporioses pulmonaires invasives diagnostiqués entre 1955 et 2010, d'après Kantarcioglu *et al.* (2012).

### b. Infections disséminées

Les infections profondes à *S. apiospermum* sont presque exclusivement observées chez des patients présentant des désordres sévères de l'immunité innée (leucémies lymphoïdes ou myéloïdes chroniques, cancers solides, lupus érythémateux disséminé) ou ayant subi une greffe de moelle osseuse ou une transplantation d'organes. Ces infections sont d'évolution rapide et la plupart des scédosporioses profondes affectent plusieurs organes. La dissémination est supposée être d'origine hématogène, mais les hémocultures étant généralement négatives, le mécanisme n'est pas réellement élucidé (Guarro *et al.*, 2006).

### c. Atteintes du système nerveux central (SNC)

Le premier cas de scédosporiose du système nerveux central a été rapporté en 1948 (Nesky *et al.*, 2000; Guarro *et al.*, 2006). Une revue de la littérature réalisée en 2000 portant sur les infections du SNC provoquées par *S. apiospermum* a montré que la majorité des cas consistent en la présence d'un ou plusieurs abcès du parenchyme cérébral (76,9% des cas). Mais des cas de méningites ont également été décrits (Tableau 4) (Nesky *et al.*, 2000).

**Tableau 4 : Incidence des infections du SNC provoquées par *S. apiospermum* diagnostiquées de 1948 à 1998, d'après Nesky *et al.* (2000).**

Type d'infection	Nombre de cas (%)
Abcès cérébral	30 (76,9)
Solitaire	16 (41,0)
Multiple	14 (35,9)
Méningite	11 (28,0)
Ventriculite ou épendymite	3 (7,7)
Abcès rachidien dural ou épidual	2 (5,1)
Encéphalite	2 (5,1)
Infection du sinus sagittal	1 (2,6)
Inconnu	1 (2,6)

Les signes neurologiques majeurs des scédosporioses cérébrales sont des maux de tête, des parésies faciales, une raideur de la nuque, des vertiges et nausées pouvant conduire à des vomissements, des convulsions et de l'hydrocéphalie. Ces pathologies ont dans la plupart des cas une issue fatale (76% des cas). La survie des patients avec un minimum de séquelles neurologiques est largement dépendante de la précocité du diagnostic, de l'exérèse de la totalité des abcès et de l'administration d'antifongiques comme le voriconazole (Nesky *et al.*, 2000).

Les deux principaux facteurs de risque sont les traitements immunosuppresseurs et les phénomènes de presque-noyade (Tableau 5).

**Tableau 5 : Principaux facteurs de risque dans les cas de scédosporiose du SNC diagnostiqués de 1948 à 1998, d'après Nesky *et al.* (2000).**

Facteur de risque	Nombre de patients (%)
Traitement immunosuppresseur (incluant la prednisone)	12 (30,7)
Presque-noyade	11 (28,2)
Accident d'un véhicule motorisé (associé à l'aspiration d'eau stagnante)	6 (15,4)
Chimiothérapie anticancéreuse (cytotoxique)	4 (10,3)
Diabète sucré	4 (10,3)
Inoculation directe (traumatisme orbitaire ou ponction lombaire)	3 (7,7)
Immunodéficience (infection VIH ou lupus érythémateux systémique)	2 (6,9)
Non identifié	6 (15,4)

Les infections à *S. apiospermum* faisant suite à des presque-noyades ont fait l'objet d'une revue analysant les 23 cas publiés entre 1950 et 2006. Les patients concernés étaient jeunes (24 ans en moyenne), immunocompétents (20/23 cas), et il s'agissait majoritairement d'hommes (ratio H/F 2,5:1). Ces infections consistaient principalement en des scédosporioses cérébrales (21/23 cas) se manifestant par la présence d'un ou plusieurs abcès du parenchyme cérébral. Le diagnostic a été obtenu par culture du liquide de ponction de l'abcès cérébral dans la plupart des cas (Katragkou *et al.*, 2007). L'affinité neurotropicque de *S. apiospermum* pour le système nerveux central serait liée à son affinité pour le fer libre qui est présent dans le système nerveux central à la différence du plasma (Buzina *et al.*, 2006).

#### 2.4. Écologie des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*

*Scedosporium apiospermum* est un champignon filamenteux saprophyte plus fréquemment retrouvé dans les climats tempérés que dans les climats tropicaux (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008).

Actuellement, son habitat naturel n'est pas clairement identifié. En revanche, ce champignon a été isolé de l'environnement de manière sporadique dans de multiples études. Ainsi, il apparaît que la présence de *S. apiospermum* est le plus souvent associée à des substrats riches en nutriments, tels que le sol (Ajello, 1952; Ajello, 1956; Sotgiu *et al.*, 1966; Kurup and Schmitt, 1970). *Scedosporium apiospermum* a ainsi été mis en évidence à de maintes reprises dans les fumiers d'animaux d'élevage, que ce soit de volailles ou de bétail (Alteras and Evolceanu, 1969; Bell, 1976; Rippon and Carmichael, 1976; Bell, 1978). Il a aussi été isolé dans des études environnementales recherchant *Histoplasma capsulatum* à partir d'excréments de chauve-souris, de poulets ou de merles (Brandsberg *et al.*, 1969; Ajello *et al.*, 1977; Vissienon, 1999). En 1984, lorsqu'un exploitant agricole a manifesté une otite purulente, et que des cultures du liquide jaunâtre et granuleux qui s'en écoulait ont révélé la présence de *P. boydii*, une enquête environnementale sur la propriété du patient a été menée pour identifier l'origine de sa contamination, ce champignon filamenteux a été mis en évidence à partir de terre collectée dans les champs de tabac de sa ferme (Bakerspigel and Schaus, 1984). En 1989, la terre de plantes en pot présentes dans l'enceinte d'un hôpital a été analysée par culture. La flore fongique décrite par les auteurs a notamment révélé une charge importante de *S. apiospermum* dans ces prélèvements

suggérant que les plantes en pot constituent un réservoir de matériel fongique à risque infectieux particulièrement important (Summerbell *et al.*, 1989). En 2007, un travail similaire a été mené au domicile de patients atteints de mucoviscidose pour lesquels *S. apiospermum* avait été isolé lors de l'examen mycologique de leurs crachats. Aucun des prélèvements d'air (n = 18) et d'eau (n = 9) ne s'est avéré positif pour *S. apiospermum*. Un seul prélèvement de surface (n = 52) a mis en évidence ce champignon. En revanche, 72% des prélèvements de terre des plantes en pot (41/57) ont révélé la présence de *S. apiospermum*, ceci soulignant le risque infectieux que constituent les plantes en pot au domicile des patients réceptifs (Sidot *et al.*, 2007).

*Scedosporium apiospermum* est également présent dans des milieux aquatiques, notamment dans des eaux riches en nutriments, fortement polluées et ayant une consistance épaisse. Ce champignon a ainsi été isolé d'eaux d'égout (Rippon, 1988), de boues prélevées au fond de mares stagnantes (Cooke and Kabler, 1955; Llanos and Kjøller, 1976; Fisher *et al.*, 1982), de boues d'épuration collectées dans des usines de traitement des eaux usées (Janda-Ulfig *et al.*, 2008), ou de boues recouvertes d'eaux saumâtres ou salées (Pawar *et al.*, 1963; Dabrowa *et al.*, 1964; Kirk, 1967). Ces environnements peu aérés et riches en nutriments peuvent aussi être à l'origine d'une colonisation asymptomatique des cavités d'animaux y vivant (de Hoog *et al.*, 1994; Elad, 2011). *Scedosporium apiospermum* a été isolé de poumons de lézards (Gugnani and Okafor, 1980), de gerbilles (Gugnani, 1972), du pharynx d'ânes (El Allawy *et al.*, 1977) et du tractus gastro-intestinal inférieur de pigeons (Ramirez *et al.*, 1976). Une seule étude portant sur les flores bactérienne et fongique des eaux de piscines publiques a identifié *S. apiospermum* à partir d'échantillons d'eau (Aho and Hirn, 1981).

L'isolement sporadique de *S. apiospermum* dans des environnements peu aérés a permis de mettre en évidence les propriétés particulières de ce champignon filamenteux. En effet, ce champignon thermotolérant est capable de survivre dans des milieux peu aérés ou présentant une forte pression osmotique et tolère aussi de fortes concentrations en sel pouvant atteindre 5% (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008). De plus, des souches de *S. apiospermum* isolées de sol prélevé dans des fosses à combustion de résidus pétroliers ont permis de mettre en évidence la capacité de ce champignon à dégrader des hydrocarbures aliphatiques (April *et al.*, 1998; April *et al.*, 1999). D'autres travaux menés sur une souche de *S. apiospermum* isolée de sol agricole ont établi que ce champignon est capable de dégrader différents composés aromatiques, comme le phénol, le *p*-crésol, le diaryl ester phénylbenzoate, le *p*-tolylbenzoate ou le 4-chlorophénylbenzoate (Figure 21)

(Claußen and Schmidt, 1998; Claußen and Schmidt, 1999). Ces études soulignent le rôle-clé que pourrait présenter *S. apiospermum* dans la bioremédiation *in situ* de sites pollués. Ainsi, deux brevets français ont été déposés par la société Biovitis S.A. visant à développer le traitement biologique d'effluents d'élevage (Laugero and Tillier, 2008) et d'effluents riches en matière organique par un inoculum fongique composé de *S. apiospermum* (Berthon and Grizard, 2003). L'utilisation de *S. apiospermum* en tant que promoteur de compostage a aussi fait l'objet d'un dépôt de brevet. L'inventeur a proposé de pulvériser des cultures de ce champignon sur des débris végétaux pour favoriser le compostage à basse température (Nomoto, 2003).

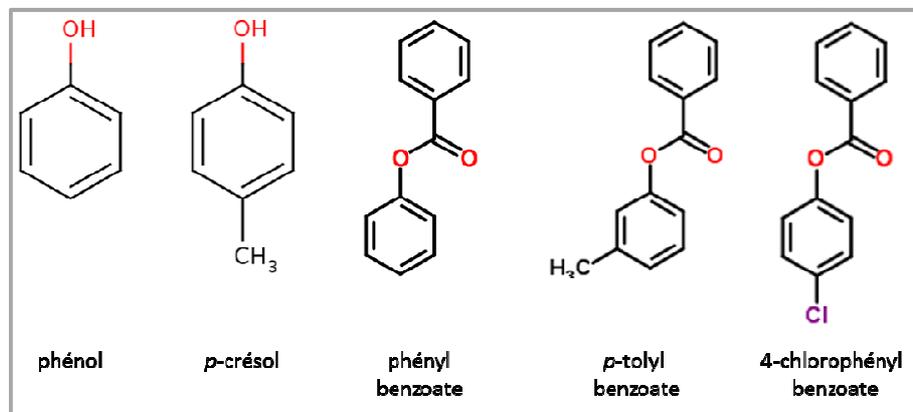


Figure 21 : Exemples de composés aromatiques dégradés par *S. apiospermum*.

Les études récentes de phylogénie définissant *P. boydii* / *S. apiospermum* comme un complexe d'espèces ont débouché sur des travaux visant à définir les niches écologiques de chacune de ces espèces. Ainsi, des prélèvements de sol réalisés en Autriche et aux Pays-Bas ont révélé l'abondance de *S. apiospermum* et *S. dehoogii* dans les sites agricoles et les sites urbains et industriels (Kaltseis *et al.*, 2009). En Australie, l'espèce la plus fréquemment isolée dans le centre-ville de Sydney était *S. aurantiacum* (Harun *et al.*, 2010). Les environnements naturels, tels que les forêts et les plages, n'ayant pas conduit à la mise en évidence d'espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, il semblerait que les activités humaines favorisent la présence et la croissance de champignons filamenteux opportunistes, et qu'il existe une association étroite entre le degré d'activités humaines et la densité fongique (Kaltseis *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2010).

## 2.5. Méthodes de détection et d'identification

Actuellement, la détection des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* est réalisée principalement à l'aide de méthodes culturales. Or, elles présentent certains inconvénients. Lors de l'analyse microbiologique d'un prélèvement, qu'il soit d'origine clinique ou environnementale, le milieu de culture utilisé, la température et le temps d'incubation exercent un rôle prépondérant sur la croissance des micro-organismes. En effet, certains peuvent être dans des conditions propices à leur croissance, et d'autres non. De plus, les micro-organismes qui sont dans des conditions optimales peuvent présenter une croissance extensive et ainsi masquer d'autres micro-organismes à croissance plus lente. L'inconvénient est alors d'avoir une surreprésentation des germes à croissance extensive. Le risque des méthodes culturales est de ne pas refléter la teneur réelle de l'échantillon analysé en micro-organismes, aussi bien en terme de biodiversité qu'en terme de quantité (Rainer *et al.*, 2008).

Le développement de milieux de culture plus sélectifs que le milieu YPDA classique sera abordé dans une première partie. Les méthodes non culturales seront développées dans une seconde partie. Enfin, une troisième partie sera consacrée aux méthodes d'identification précise des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*.

### 2.5.1. Méthodes culturales

En France, les premières descriptions de *S. apiospermum* dans le contexte de la mucoviscidose ont été réalisées dans une situation particulière. En effet, des cultures effectuées à partir d'expectorations de trois patients CF s'avérant positives pour *A. fumigatus*, un traitement a été réalisé par itraconazole, et il a permis l'éradication de ce champignon. Cependant, un autre champignon filamenteux à croissance plus lente a été mis en évidence dans les expectorations ultérieures, *S. apiospermum*, suggérant que sa présence avait été masquée lors de l'examen mycologique des premières expectorations (Chabasse *et al.*, 1991).

L'utilisation de milieux de culture semi-sélectifs, inhibant la croissance des *Aspergillus*, apparaît donc essentielle.

### a. Milieux de culture semi-sélectifs de première génération

Au cours des années 70, Jarvis et ses collaborateurs (Jarvis, 1973) ont décrit une gélose composée de rose bengale (50 µg/mL) et de chlortétracycline. Les actions combinées du colorant et de l'antibiotique permettaient une inhibition de la croissance des bactéries et une limitation de la sporulation des moisissures. En parallèle, King et ses collaborateurs (King *et al.*, 1979) ont mis en évidence l'activité inhibitrice du dichloran sur la croissance des Mucorales en l'ajoutant à un milieu de culture basique pour la recherche de levures et de moisissures dans les aliments. Ce milieu ajusté à pH 5,6 était constitué de glucose, de peptone, d'agar, de sulfate de magnésium heptahydrate ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), de dihydrogénophosphate de potassium ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) et de chlortétracycline. Par la suite, ces mêmes auteurs ont développé un milieu de culture plus sélectif en ajoutant le dichloran à la gélose rose bengale - chlortétracycline de Jarvis. Leurs résultats ont montré que l'introduction du dichloran (2 µg/mL), la diminution de la concentration de rose bengale (25 µg/mL) et l'ajustement du pH à 5,6 permettaient la mise en évidence d'une plus grande biodiversité (King *et al.*, 1979; Hocking and Pitt, 1980). Plus tard, la chlortétracycline a été substituée par le chloramphénicol. Cet antibiotique étant stable à la chaleur, le milieu de culture peut être préparé en un temps et utilisable directement après la stérilisation par autoclavage (Downes and Ito, 2001).

En 1993, la tolérance au bénomyl de champignons filamenteux pathogènes de la famille des Microascacées, dont *Pseudallescheria boydii*, a été mise en évidence par Summerbell (Summerbell, 1993). Ces auteurs ont alors suggéré que des milieux de culture supplémentés en bénomyl seraient très utiles aux laboratoires menant des études épidémiologiques ou écologiques sur ces champignons. Par la suite, le milieu de culture DRBC additionné de bénomyl a effectivement été utilisé avec succès pour la détection du complexe d'espèces *P. boydii* / *S. apiospermum* à partir du sol (Gilgado *et al.*, 2005; Sidot, 2006). Ce milieu de culture a également fait ses preuves dans le cadre du programme hospitalier de recherche clinique PHRC-1902 « MucoFong » 2007 - 2010 proposé pour analyser le rôle des micromycètes dans l'évolution de l'état respiratoire des patients atteints de mucoviscidose (Van Grunderbeeck *et al.*, 2010).

### b. Milieux de culture semi-sélectifs de dernière génération

Un milieu de culture semi-sélectif des espèces des genres *Scedosporium* et *Pseudallescheria*, baptisé SceSel+, a été développé en 2008 dans la perspective de mener une étude environnementale visant à identifier leurs habitats potentiels. Rainer et ses collaborateurs (Rainer *et al.*, 2008) ont tout d'abord confirmé que l'ajout du bénomyl à la gélose MLA (Leonian's agar modifiée) n'avait pas d'effet délétère sur la croissance des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. Le dichloran a été ajouté au milieu de culture pour éviter le développement trop important des Zygomycètes tolérant le bénomyl, comme les Mucorales. Deux antibiotiques n'ayant pas d'effet négatif sur la croissance de *P. boydii* / *S. apiospermum*, la ciprofloxacine et la streptomycine, ont aussi été incorporés pour limiter la prolifération des bactéries telluriques (Tableau 6).

**Tableau 6 : Composition de différents milieux de culture, d'après Summerbell (1993) et Rainer *et al.* (2008).**

Composants	Gélose de Leonian	Gélose de Leonian modifiée (MLA)	MLA - bénomyl	SceSel+
Extrait de malt	X	X	X	X
Maltose	X	X	X	X
Peptone	X	X	X	X
Agar	X	X	X	X
Sulfate de magnésium heptahydrate (MgSO <sub>4</sub> -7H <sub>2</sub> O)	X	X	X	X
Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	X	X	X	X
Extrait de levures		X	X	X
Bénomyl			X	X
Chloramphénicol				X
Dichloran				X
Ciprofloxacine				X
Sulfate de streptomycine				X

Un autre milieu de culture semi-sélectif des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, dénommé Scedo-Select III, a été développé au sein du laboratoire en 2010. La capacité de différentes sources d'azote et de carbone à promouvoir la croissance de ces espèces et/ou à réduire celle d'autres moisissures telluriques a été testée. Pour augmenter la sélectivité du milieu de culture, les peptones (hydrolysats de protéines végétales ou animales) qui constituent des sources d'azote habituellement utilisées en mycologie, ont été

remplacées par des sources d'azote inorganique. Parmi les trois composés testés, le sulfate d'ammonium ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) et le nitrite de sodium (NaNO<sub>2</sub>) provoquaient une légère réduction de la capacité de croissance des souches de *P. boydii* / *S. apiospermum*, mais inhibaient de manière importante celle d'*A. fumigatus*. Les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* étant capables de dégrader les composés aliphatiques et aromatiques (page 55), leur croissance a été évaluée en présence de 12 hydrocarbures différents comme seule source de carbone et d'énergie. Les résultats ont montré que le 4-hydroxybenzoate (4-HOC<sub>6</sub>H<sub>4</sub>CO<sub>2</sub>Na) permet la croissance de ces espèces à la différence de nombreuses autres moisissures environnementales. Enfin, les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* étant résistantes au bénomyl et au dichloran, cette association de fongicides a été retenue pour limiter le développement des autres champignons filamenteux à croissance extensive susceptible d'assimiler le 4-hydroxybenzoate. Dans un souci pratique, seul le chloramphénicol, antibiotique thermostable, a été intégré dans la formulation (Tableau 7) (Pham *et al.*, 2010).

**Tableau 7 : Composition du milieu de culture semi-sélectif Scedo-Select III.**

Composants	Quantité	
4-hydroxybenzoate (4-HOC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> CO <sub>2</sub> Na)	0,9	g
Sulfate d'ammonium ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	5	g
Dihydrogénophosphate de potassium (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	1,25	g
Sulfate de magnésium heptahydrate (MgSO <sub>4</sub> - 7H <sub>2</sub> O)	0,625	g
Chloramphénicol	0,5	g
Dichloran <sup>a</sup>	2	mg
Bénomyl <sup>b</sup>	8	mg
Agar	20	g
Eau distillée	qsp 1000	mL

<sup>a</sup> dissoudre dans 1 mL d'éthanol

<sup>b</sup> dissoudre dans 5 mL de méthanol

### 2.5.2. Méthodes de détection non-culturelles

Le développement de méthodes non-culturelles pour la détection des champignons filamenteux dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose est un véritable challenge pour de nombreuses équipes scientifiques. Deux objectifs principaux motivent les travaux réalisés dans ce cadre : (i) diagnostiquer les colonisations / infections fongiques le plus précocement possible pour l'instauration rapide d'un traitement efficace ; (ii) et

disposer d'outils performants pour étudier l'épidémiologie des champignons filamenteux dans le contexte de la mucoviscidose.

### a. Méthodes biochimiques

#### ➤ *Les sidérophores*

Les sidérophores sont des molécules chélatrices du fer ferrique (Fe(III) ou Fe<sup>3+</sup>) qui ne sont sécrétés par les micro-organismes que lorsqu'ils sont en condition de stress, c'est-à-dire quand la concentration du milieu environnant en Fe(III) est inférieure ou égale à 0,1 µM. Ces molécules se combinent au fer ferrique, pour lequel elles ont une forte affinité, pour former des complexes stables dénommés ferri-sidérophores. Ces éléments traversent la paroi des champignons filamenteux grâce à des canaux ou sont pris en charge par des protéines de transport du fer. Ils sont ensuite pris en charge par des perméases pour franchir la membrane plasmique (Bertrand, 2009).

Deux sidérophores, l'acide dimérumique et le N(α)-méthyl coprogène B, ont pu être identifiés pour les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* (Bertrand *et al.*, 2009). Le N(α)-méthyl coprogène B qui est produit spécifiquement par les espèces de ce complexe, peut être détecté à partir des expectorations de patients CF colonisés par ces champignons, par chromatographie liquide haute performance suivie d'une identification par spectrométrie de masse. Ainsi, le N(α)-méthyl coprogène B pourrait constituer un marqueur diagnostique rapide intéressant pour la mise en évidence d'une colonisation des patients CF par le complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* (Bertrand *et al.*, 2010).

### b. Méthodes moléculaires

#### ➤ *Amplification par PCR d'ADN totaux extraits des expectorations*

Deux méthodes d'amplification par PCR des ADN totaux extraits des expectorations de patients CF ont été développées pour la détection spécifique des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* et/ou de *S. prolificans*.

L'une consiste à amplifier les régions ITS des ADN ribosomiaux par PCR multiplexe grâce à trois couples d'amorces spécifiques des espèces *S. aurantiacum*, *P. boydii* ou *S. prolificans* (Harun *et al.*, 2011). L'autre est basée sur l'amplification d'une portion du gène codant la

$\beta$ -tubuline des espèces du complexe (sauf *S. dehoogii*). Les amplicons sont ensuite transférés sur une membrane de nylon et détectés par hybridation de sondes (oligonucléotides marqués) spécifiques de chaque espèce (Lu *et al.*, 2011a).

Ces méthodes de détection spécifique d'un pathogène particulier ou d'un groupe de pathogènes comme les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* répondent principalement à des problématiques épidémiologiques ciblées. En laboratoire hospitalier, le but étant de détecter l'ensemble des espèces en présence, d'autres méthodes de détection doivent être envisagées.

#### ➤ **Puces à ADN**

La technologie des puces à ADN a permis le développement d'une méthode de détection directe de l'ADN fongique extrait des expectorations des patients CF. Cette analyse consiste en l'amplification par PCR des régions ITS des ADN ribosomiaux et l'hybridation avec des sondes nucléotidiques spécifiques d'espèces. Cette analyse a été validée pour la détection de 20 espèces de champignons filamenteux et de levures (Figure 22).

Cette technique apparaît plus performante que l'examen mycologique des crachats, malgré l'utilisation dans cette étude de cinq milieux de culture différents et de deux températures d'incubation. En effet, cette méthode a fourni des résultats concordants avec ceux obtenus par culture pour 28% des expectorations analysées et permis la détection d'espèces supplémentaires pour 58% des échantillons (Bouchara *et al.*, 2009).

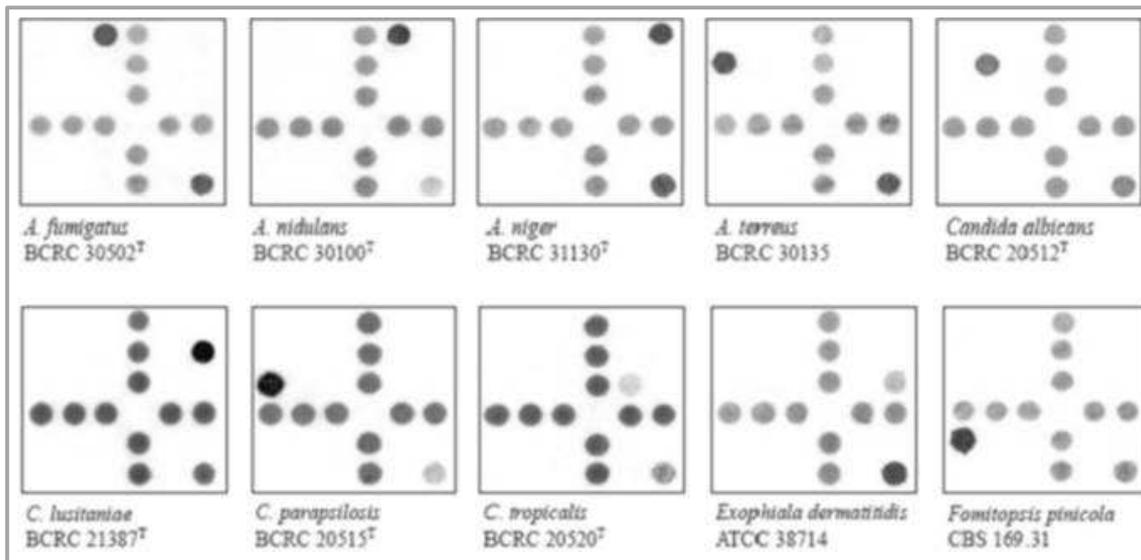


Figure 22 : Profils d'hybridation de 10 germes pouvant coloniser les voies aériennes des patients CF, selon Bouchara *et al.* (2009).

### ➤ PCR - ESI - TOF / MS

La PCR - ESI - TOF / MS (pour *ElectroSpray Ionization - Time Of Flight - Mass Spectrometry*) consiste en l'amplification par PCR multiplexe d'un groupe de pathogènes (bactéries, virus,...). Les produits d'amplification obtenus sont ensuite ionisés, puis injectés dans un tube de vol. Un spectromètre de masse détecte ces molécules selon leur charge et leur masse. Un algorithme convertit la masse des amplicons en teneur en acide nucléique (adénine, guanine, cytosine et thymine), puis identifie les micro-organismes en présence par comparaison avec une base de données (Wolk *et al.*, 2012).

Cette méthode est suffisamment sensible pour détecter les pathogènes directement dans les échantillons biologiques comme les liquides obtenus lors de lavages broncho-alvéolaires, et possède un pouvoir discriminant tellement important qu'il est possible de distinguer plusieurs espèces au sein d'un seul échantillon (Shin *et al.*, 2013; Simner *et al.*, 2013).

Toutefois, cette analyse possède certaines limites qui devront être prises en compte pour le développement à venir des bases de données. Le risque de contamination liée à la manipulation des produits d'amplification et à la présence de germes dans l'environnement est important. Pour s'affranchir de ce type de problème, les locaux doivent être sous pression positive et les manipulateurs rigoureux. De plus, le coût de l'appareillage et de chaque réaction restent pour l'instant encore élevés (Wolk *et al.*, 2012). Enfin, si l'apport de cette technologie dans l'analyse de prélèvements sanguins ou de sites habituellement

stériles est certain, son intérêt pour l'analyse de la flore bactérienne ou fongique des expectorations de patients CF devra être évalué.

### 2.5.3. Méthodes d'identification précise d'espèce

Bien souvent les morphologies macroscopique et microscopique ne permettent pas de préciser l'espèce d'un champignon filamenteux, surtout lorsque celui-ci appartient à un complexe. A partir de colonies pures obtenues sur milieu gélosé, différentes méthodes ont été développées pour l'identification précise de l'espèce en présence.

#### a. Séquençage de portions du génome

L'identification des champignons filamenteux peut être réalisée par comparaison entre des séquences de portions du génome obtenues par PCR et des séquences de référence disponibles sur NCBI. L'analyse des séquences des régions ITS 1 et 2 et de la sous-unité 5,8S des ADN ribosomiaux permet de préciser le genre, voire l'espèce des champignons filamenteux (Figure 23).

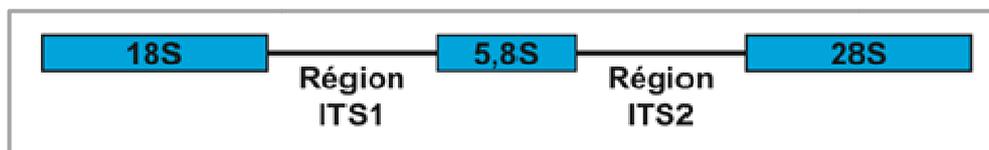


Figure 23 : Position des régions ITS 1 et 2 au sein des gènes codant les ARN ribosomiaux.

Dans certains cas, d'autres régions du génome doivent être séquencées. Ainsi, la région codant le facteur d'élongation E $\alpha$  peut être séquencée pour l'identification des espèces du genre *Fusarium* (Kristensen *et al.*, 2005). Mais dans la plupart des autres cas, l'analyse d'une portion du gène codant la  $\beta$ -tubuline s'avère la plus adaptée pour l'identification au rang d'espèce, comme la portion TUB de ce gène pour les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* (Cruse *et al.*, 2002; Gilgado *et al.*, 2005; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2013).

## b. Spectrométrie de masse de type MALDI - TOF

### ➤ **Principe**

La technologie MALDI - TOF / MS (pour *Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight / Mass Spectrometry*) est une méthode récemment développée pour l'identification rapide et précise de micro-organismes.

Elle est composée de trois unités fonctionnelles : (i) une source d'ions qui assure l'ionisation et la vaporisation des molécules de l'échantillon ; (ii) un analyseur de masse séparant les ions selon leur masse et leur charge ; (iii) un détecteur des ions ainsi séparés.

La technologie MALDI assure la production d'ions par désorption / ionisation. L'échantillon est piégé dans une matrice composée de petites molécules acides, comme l'acide  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamique (CHCA), qui est ensuite soumise à de brèves impulsions laser. La matrice absorbe l'énergie de ces impulsions et l'utilise pour la désorption des molécules qui sont vaporisées et ionisées. Les molécules ainsi obtenues sont accélérées grâce à un champ électrostatique, puis injectées dans un tube de vol. Le temps de vol (TOF) nécessaire aux ions pour rejoindre le détecteur varie avec leur masse et leur charge, les plus petits ions voyageant plus rapidement que les plus volumineux. Les ions séparés selon leur temps de vol sont détectés à l'aide d'un spectromètre de masse (MS). Le spectre obtenu est caractérisé par le ratio masse / charge et l'intensité des ions et correspond à la signature de l'échantillon (Figure 24). Cette dernière est comparée à une base de données qui permet l'identification du micro-organisme au rang de genre ou d'espèce (Croxatto *et al.*, 2012).

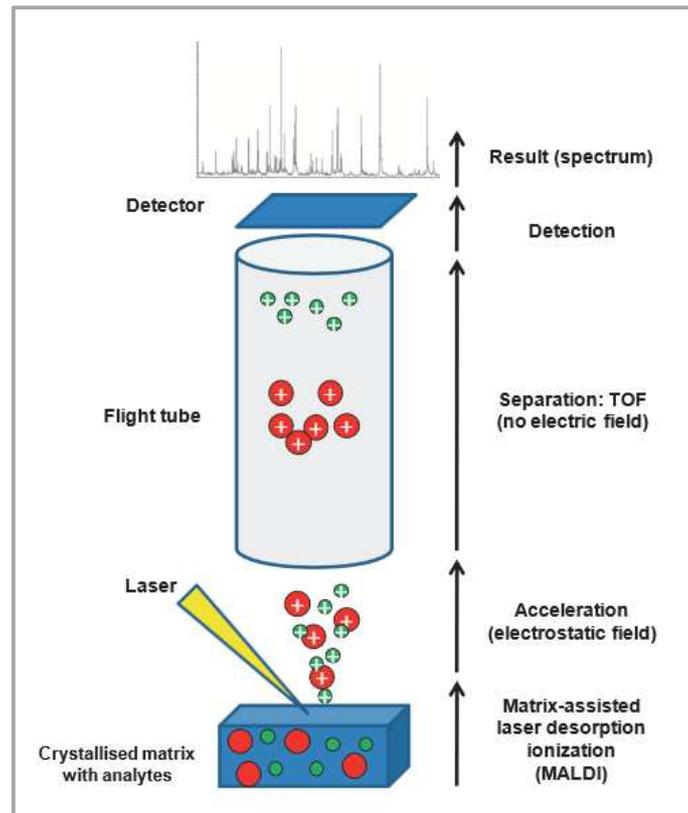


Figure 24 : Principe de la technologie MALDI-TOF/MS, selon Croxatto *et al.* (2012).

➤ **Identification des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum***

Les premiers travaux d'identification de champignons filamenteux utilisant la technologie MALDI - TOF / MS ont défini trois spectres caractéristiques de *Penicillium* spp., *Neoscytalidium dimidiatum* et *Trichophyton rubrum* (Welham *et al.*, 2000) ouvrant la voie à de nombreuses études qui ont confirmé l'intérêt de cette méthode dans cette application (Croxatto *et al.*, 2012). Cependant, les bases de données doivent encore être enrichies pour permettre une identification au rang d'espèce, notamment pour les complexes d'espèces récemment décrits.

Une base de données spécifique des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* a néanmoins été développée par le service de Microbiologie de l'Hôpital Necker-Enfants-Malades à Paris. Grâce aux spectres obtenus, une identification au rang d'espèce est possible, sans extraction préalable des protéines, ni standardisation des cultures (Sitterlé *et al.*, soumis pour publication).

# TRAVAIL EXPERIMENTAL

L'ensemble des travaux expérimentaux réalisés au cours de ma thèse, ayant pour objectif d'apporter une meilleure connaissance de la distribution dans la mucoviscidose et de l'écologie du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, se situant au deuxième rang des champignons filamenteux isolés des voies respiratoires des patients CF, est synthétisé dans ce chapitre.

✓ La première étude, publiée dans la revue *Medical Mycology*, porte sur la distribution des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* chez des patients français atteints de mucoviscidose et leur capacité à coloniser de manière chronique les voies aériennes de ces patients.

✓ La deuxième étude, aujourd'hui soumise pour publication, décrit l'écologie des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* en France, en particulier dans la région Pays-de-la-Loire.

✓ La troisième étude, encore en cours, se focalise sur le développement d'une méthode moléculaire de détection et de quantification des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* dans des échantillons de sol.

## Introduction de l'étude 1

*Scedosporium apiospermum* (initialement considéré comme l'anamorphe de *Pseudallescheria boydii*) se situe au deuxième rang des champignons filamenteux isolés des expectorations de patients atteints de mucoviscidose avec une fréquence comprise entre 2% et 17,4% (Cimon *et al.*, 1995; Cimon *et al.*, 2000; Williamson *et al.*, 2001; Rainer *et al.*, 2007; Heath *et al.*, 2009; Horré *et al.*, 2009; Blyth *et al.*, 2010a; Paugam *et al.*, 2010; Blyth *et al.*, 2010b; Manso *et al.*, 2011) selon les études. Des travaux récents de phylogénie basées sur des analyses morphologiques, physiologiques et génétiques ont cependant établi que *S. apiospermum* est un complexe d'espèces comprenant au moins cinq espèces distinctes : *Scedosporium aurantiacum*, *Pseudallescheria minutispora*, *Scedosporium dehoogii*, *S. apiospermum sensu stricto* et *P. boydii*, cette dernière consistant en quatre sous-groupes étroitement liés nommés *P. boydii sensu stricto*, *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria ellipsoidea* et *Pseudallescheria fusoides* (Gilgado *et al.*, 2005; Gilgado *et al.*, 2008).

Ces espèces présentant des sensibilités différentes aux antifongiques (Gilgado *et al.*, 2009; Lackner *et al.*, 2012), nous nous sommes proposés de déterminer leur fréquence respective dans le contexte de la mucoviscidose. Comme des travaux réalisés antérieurement au sein de notre laboratoire avaient démontré la capacité des espèces *P. boydii* et *S. apiospermum*   coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients CF (Defontaine *et al.*, 2002), nous avons par ailleurs étudié cette propriété pour *S. aurantiacum* et *P. minutispora*.

Un panel de 68 isolats collectés à partir d'expectorations ou d'aspirations bronchiques provenant de 50 patients atteints de mucoviscidose suivis dans 12 hôpitaux de France (Angers, Caen, Giens, Grenoble, Le Mans, Lille, Paris, Rouen, Toulouse, Tours et Vannes) a été utilisé dans cette étude. L'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen), quelques modifications ayant été apportées au protocole du fournisseur pour améliorer l'efficacité de l'extraction d'ADN fongique. L'identification moléculaire a consisté en l'amplification par PCR de quatre régions de l'ADN génomique (les régions ITS des ADN ribosomiaux, ITS ; une portion du gène de la calmoduline, CAL ; et deux fragments du gène de la  $\beta$ -tubuline, BT2 et TUB). Les produits d'amplification ont été purifiés et séquencés dans les deux sens. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été comparées à une banque nucléotidique (BLASTn, pour *Basic Local Alignment Search Tool nucleotide*) disponible en ligne sur le site internet du NCBI. Les séquences de référence publiées par Gilgado *et al.* (2005) ont été utilisées pour l'identification de nos isolats.

L'analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques des quatre loci a mis en évidence quatre clusters principaux correspondant aux espèces *S. aurantiacum*, *P. minutispora*, *S. apiospermum* et *P. boydii*, cette dernière montrant la plus grande variabilité et comportant le sous-groupe *P. ellipsoidea*. En terme de fréquence, *P. boydii* prédominait largement (62%), suivi de *S. apiospermum* (24%) et *S. aurantiacum* (10%). *Pseudallescheria minutispora* n'a été isolé qu'à partir de deux patients (4%) et *S. dehoogii* n'a pas été retrouvé.

L'analyse statistique des caractéristiques des 50 patients (sexe, origine géographique et espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*) les a séparés en cinq classes. La classe 1 (quatre patients) était caractérisée de manière significative par la présence d'espèces du sous-groupe *P. ellipsoidea*, la classe 2 (27 patients) par celle d'espèces de sous-groupes de *P. boydii* autres que *P. ellipsoidea*, et la classe 3 (12 patients) par la présence de *S. apiospermum*. La classe 4 (deux patients) était significativement associée à la présence de *P. minutispora* et la classe 5 (cinq patients) à celle de *S. aurantiacum*. De plus, la classe 2 était négativement associée au nord de la France, et la classe 3 à l'ouest du pays, suggérant une répartition différente des espèces du complexe.

Les fréquences respectives que nous avons déterminées dans notre étude diffèrent des résultats publiés précédemment. En effet, *P. boydii* a été identifié par Kaltseis *et al.* (2009) comme l'espèce la moins fréquente dans l'environnement (1,9% - 2,3%) et comme responsable d'un tiers des cas cliniques seulement alors que dans notre étude, cette espèce est la plus fréquemment isolée (62%) dans le contexte de la mucoviscidose. A l'inverse, *S. apiospermum* est l'espèce prédominante en Autriche tant dans l'environnement (58,7% - 77%) qu'en clinique (57%), alors qu'elle n'est que modérément retrouvée dans notre travail (24%).

La capacité de *P. boydii* et *S. apiospermum* à coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose a été démontrée par RAPD dans des travaux antérieurs sur des périodes allant de 0,5 à 12 mois et de 9 à 13 mois respectivement (Defontaine *et al.*, 2002; Gilgado *et al.*, 2005). Par ailleurs, *S. aurantiacum* est une espèce fréquemment isolée des expectorations des patients CF en Australie, toutefois les données de géotypage font défaut (Blyth *et al.*, 2010b). Enfin, un seul cas de détection de *P. minutispora* a été rapporté, à partir d'une expectoration d'un patient CF, par une méthode d'amplification de l'ADN génomique suivie d'une hybridation (RLB-PCR), mais les cultures réalisées en parallèle étaient négatives (Lu *et al.*, 2011a).

Dix-huit isolats multiples (provenant d'un même prélèvement) ou séquentiels (issus de prélèvements successifs effectués chez un même patient) provenant de deux patients P14 et P3 ont été analysés par RAPD. Un patient est considéré comme colonisé de manière chronique lorsqu'un même génotype est retrouvé à partir d'au moins trois expectorations distinctes collectées sur une période de plus de six mois.

Le typage par RAPD de quatre isolats séquentiels collectés pour le patient P14 sur une période de 15 mois a révélé la présence de deux génotypes. Les séquences nucléotidiques obtenues par PCR pour le génotype #1 correspondaient à *P. minutispora* et pour le génotype #2 à *P. ellipsoidea*. Le génotype #1 a été isolé trois fois sur une période de 15 mois, ce qui démontre que *P. minutispora* est capable lui aussi de coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients.

Un total de 16 isolats multiples et/ou séquentiels a été collecté à partir du patient P3 sur une période de cinq ans. Six génotypes ont ainsi été mis en évidence par RAPD : les génotypes #3, #4 et #8 ont été identifiés par séquençage comme *P. boydii* et les génotypes #5, #6 et #7 comme *S. aurantiacum*. Pour ce patient, le génotype #6 s'est avéré largement prédominant puisqu'il a été isolé à quatre reprises sur une période de deux ans et demi démontrant que *S. aurantiacum* est capable de coloniser de manière chronique le tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose.

Dans notre étude, nous avons démontré que ces deux espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* sont aussi capables de coloniser de manière chronique le tractus respiratoire des patients atteints de mucoviscidose, un même génotype de *S. aurantiacum* persistant dans les sécrétions respiratoires sur une période de 2 ans et pour *P. minutispora*, sur une période de 15 mois.

## **ETUDE 1 : Distribution des différentes espèces du complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* chez des patients français atteints de mucoviscidose**

**Publiée dans la revue Medical Mycology 2013, 51(6) : 603 - 613**

Rachid Zouhair\*†<sup>a</sup>, Amandine Rougeron\*‡<sup>a</sup>, Bienvenue Razafimandimby\*, Abdessamad Kobi§, Jean-Philippe Bouchara\*‡, Sandrine Giraud\*

\* LUNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Angers, † Faculté des sciences, Université Moulay Ismail, Meknès, Maroc, ‡ Centre Hospitalier Universitaire, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Angers, et § LUNAM Université, Université d'Angers, Laboratoire en sûreté de fonctionnement qualité et organisation, Angers, France

<sup>a</sup> Ces auteurs ont contribué de manière équivalente à cet article.

Comme de nouvelles espèces possédant des sensibilités différentes aux antifongiques ont été récemment décrites au sein du complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum*, cette étude a été menée dans le but de déterminer leur fréquence respective dans le contexte de la mucoviscidose. Les résultats ont montré que *P. boydii* prédominait largement (62%), suivi de *S. apiospermum* (24%), *Scedosporium aurantiacum* (10%) et *Pseudallescheria minutispora* (4%). *Scedosporium dehoogii* n'a pas été retrouvé dans cette étude. L'analyse factorielle des correspondances multiples a mis en évidence des différences géographiques dans la distribution des espèces : *P. boydii* était rarement rencontré dans le nord de la France, alors que *S. apiospermum* était moins représenté dans l'ouest du pays. De plus, nous avons démontré que toutes les espèces rencontrées dans le contexte de la mucoviscidose étaient capables de coloniser de manière chronique le tractus respiratoire des patients. Le typage moléculaire d'un grand nombre d'isolats environnementaux et cliniques devrait être réalisé pour définir l'épidémiologie de chacune des espèces du complexe.

# Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis

Rachid Zouhair\*†<sup>a</sup>, Amandine Rougeron\*‡<sup>a</sup>, Bienvenue Razafimandimby\*, Abdessamad Kobi§, Jean-Philippe Bouchara\*‡, Sandrine Giraud\*

\* LUNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Angers, † Faculté des sciences, Université Moulay Ismail, Meknès, Maroc, ‡ Centre Hospitalier Universitaire, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Angers, et § LUNAM Université, Université d'Angers, Laboratoire en sûreté de fonctionnement qualité et organisation, Angers, France

<sup>a</sup> These authors contributed equally to this article.

Received 1 October 2012; Received in final revised form 5 December 2012; Accepted 9 January 2013.

**As various new sibling species within the *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* complex have been described recently with differences in their susceptibility to antifungals, this study was conducted in order to determine their respective frequency in cystic fibrosis. Results indicated that *Pseudallescheria boydii* largely predominated (62%), followed by *S. apiospermum* (24%), *Scedosporium aurantiacum* (10%) and *Pseudallescheria minutispora* (4%). *Scedosporium dehoogii* was not recovered in this study. The multiple correspondence factor analysis highlighted geographical discrepancies within species distribution: *P. boydii* was rarely encountered in Northern France, while *S. apiospermum* was less represented in the west of the country. Additionally, we demonstrated that all species encountered in the cystic fibrosis context were capable to chronically colonize the respiratory tract of patients. Molecular typing of a large set of environmental and clinical isolates should be conducted to delineate the epidemiology of each sibling species in the complex.**

R. Zouhair, A. Rougeron, B. Razafimandimby, J.P. Bouchara and S. Giraud are members of the ECMM/ISHAM Working group on Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis (Fri-CF). This study was presented in part during the 5th congress Trends in Medical Mycology that was held in Valencia, Spain, on October, 2-5, 2011.

Correspondence: Sandrine Giraud, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Institut de Biologie en Santé-IRIS, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers cedex 9, France. Phone: +33 (0)2 44 68 83 64; Fax: +33 (0)2 41 22 67 09; e-mail: [sandrine.giraud@univ-angers.fr](mailto:sandrine.giraud@univ-angers.fr)

## Introduction

With an incidence of approximately 1 in 2500 live births, cystic fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disorder in the European Caucasian population [1]. In the respiratory tract of CF patients, defect in the mucociliary clearance and thickening of the bronchial mucus resulting from mutations in the gene encoding the Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator (CFTR), allow the entrapment of airborne bacteria and fungal spores and provide a suitable environment for growth of microorganisms [2]. This may lead to true respiratory infections which are the major cause of morbidity and mortality in CF patients [3]. The role of bacteria such as *Staphylococcus aureus* or *Pseudomonas aeruginosa* in acute pulmonary exacerbations and CF lung deterioration is well-established, but fungal colonization of the airways and possible subsequent respiratory infections are increasingly gaining attention [4]. Most studies have focused on *Aspergillus fumigatus* and the allergic broncho-pulmonary aspergillosis (ABPA) which prevalence is 1-15% [5]. However, the fungal biota colonizing the CF lung is largely more complex and includes various non-*Aspergillus* filamentous fungi such as species of the *Scedosporium* genus, *Exophiala dermatitidis* or *Geosmithia argillacea* now called *Rasamsonia argillacea* [6-10]. The pathogenic role of these fungi in progression of the CF lung disease remains poorly documented. Nevertheless, some clinicians consider the detection of *Scedosporium* species from respiratory secretions of CF patients as a contra-indication for lung transplantation. This is based on the low susceptibility of these fungi to current antifungal drug, and on recent cases of CF lung transplant recipients previously colonized by *Scedosporium* species who developed a disseminated infection following transplantation [11-13].

With a frequency ranging from 6.5 to 10%, *S. apiospermum* (initially considered as the anamorph of *Pseudallescheria boydii*) ranks the second among the filamentous fungi colonizing the airways of CF patients [14-16]. However, recent molecular studies supported by morphological, physiological and genetic analysis showed that *S. apiospermum* is a species complex comprising at least five distinct species: *Scedosporium aurantiacum*, *Pseudallescheria minutispora*, *Scedosporium dehoogii*, *S. apiospermum* and *P. boydii*, this last species consisting of four closely related subgroups called *P. boydii sensu stricto*, *Pseudallescheria angusta*, *Pseudallescheria ellipsoidea* and *Pseudallescheria fusioidea* [17,18]. In a survey performed in Austria and The Netherlands, Kaltseis *et al.* determined the respective frequency of these sibling species in the environment. *Scedosporium apiospermum* was reported as the most common, followed by *S. dehoogii* and *S. aurantiacum* [19]. Additionally, analysis of a large set of clinical isolates also revealed

*S. apiospermum* as the most prevalent within this species complex [19]. Nevertheless, all clinical forms of scedosporiosis were combined in this set of isolates. The present study therefore was conducted in order to determine the respective frequency of the different species of the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex in the CF context. Indeed, given the variable sensitivities of the different species in the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex to antifungal drugs, the precise species-identification would facilitate targeted administration of the most appropriate antifungal drug regimen [11,12]. Additionally, genotyping was performed to investigate the capability of the recently described species to chronically colonize the respiratory tract of the patients.

## Materials and Methods

### *Isolates and culture conditions*

A collection of 50 epidemiologically unrelated isolates recovered from sputum samples or bronchial aspirates collected from an equal number of CF patients followed-up in 12 different hospitals from France (Angers, Caen, Giens, Grenoble, Le Mans, Lille, Paris, Rouen, Toulouse, Tours and Vannes) was used in this study (Table 1). Multiple (originating from the same clinical specimen) or sequential (from successive clinical samples from the same patient) isolates were used for Random Amplification of Polymorphic DNA (RAPD) experiments.

These isolates were collected over a 19-year period (1991-2010) by inoculation of clinical samples on Sabouraud dextrose agar or yeast extract-peptone-dextrose-agar (YPDA). For instance, isolates originating from Angers or Giens were obtained by inoculation of the clinical samples on two YPDA plates (containing in g/L: yeast extract, 5; peptone, 10; glucose, 20; and agar, 20) supplemented with 0.5% chloramphenicol and, for one of them, with 0.5% cycloheximide [14]. Cultures were incubated at 37°C. Identification of the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex was established on the basis of cultural features and microscopic morphology according to standard description. All *Pseudallescheria* / *Scedosporium* isolates (with a maximum of five per sample) were sub-cultured and preserved by freeze-drying. Unless otherwise specified, isolates were also deposited at the IHEM Culture Collection in the Scientific Institute of Public Health (Brussels, Belgium) to be publically available. For this study, freeze-dried isolates were reconstituted in 1 mL of ultrapure water and inoculated on YPDA. After checking purity, isolates were grown in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) broth for DNA extraction.

**Table 1** Origin, sequence data and species identification of studied isolates from French CF patients.

Patient	Sex	City (Region)	Isolation date	Clinical sample	IHEM no	Genbank accession no.				Molecular identification	
						ITS	CAL	BT2	TUB		
P1	M	Angers (West)	2006 Sep 27	Sputum	23565	JQ690901	JQ691064	JQ690954	JQ691007	<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	
P2	F	Angers (West)	2005 Jan 06	Sputum	23566	JQ690902	JQ691065	JQ690955	JQ691008	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P3	F	Angers (West)	2005 May 23	Sputum	23568 <sup>†</sup>	JQ690903	JQ691066	JQ690956	JQ691009	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	
			2002 Sep 02	Sputum	25301						
					23061	JQ690951	JQ691114	JQ691004	JQ691057	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
					23070				JQ965501	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
					23000						
					23068	JQ690952	JQ691115	JQ691005	JQ691058	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	
					23069						
					40409383/2 <sup>‡</sup>						
					40409383/3 <sup>‡</sup>						
					23080				JQ691060	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	
					23081						
					23082				JQ601061	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
					23092						
		23094									
		25299									
		25298									
P4	F	Angers (West)	2006 Sep 19	Sputum	23838	JQ690904	JQ691067	JQ690957	JQ691010	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P5	M	Angers (West)	2006 Jun 03	Sputum	23582	JQ690905	JQ691068	JQ690958	JQ691011	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P6	M	Angers (West)	2005 Jun 24	Sputum	40504117/1 <sup>§</sup>	JQ690906	JQ691069	JQ690959	JQ691012	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P7	M	Angers (West)	2007 Aug 09	Sputum	23569	JQ690907	JQ691070	JQ690960	JQ691013	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P8	M	Vannes (West)	2003 Dec 29	Sputum	23570	JQ690908	JQ691071	JQ690961	JQ691014	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P9	F	Lille (North)	2001 Dec 04	Sputum	23571	JQ690909	JQ691072	JQ690962	JQ691015	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	
P10	F	Giens (South)	1998 Jan 19	Sputum	14354	JQ690910	JQ691073	JQ690963	JQ691016	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P11	F	Vannes (West)	2004	Sputum	40407486 <sup>§</sup>	JQ690911	JQ691074	JQ690964	JQ691017	<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	
P12	F	Giens (South)	1992 Apr 23	NA	13943	JQ690912	JQ691075	JQ690965	JQ691018	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P13	M	Giens (South)	1998 Jan 08	Sputum	14268	JQ690913	JQ691076	JQ690966	JQ691019	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
P14	M	Angers (West)	2006 Mar 08	Sputum	23572 <sup>†</sup>	JQ690914	JQ691077	JQ690967	JQ691020	<i>Pseudallescheria minutispora</i>	
			2006 Jun 09	Sputum	23830	JQ690953	JQ691116	JQ691006	JQ691059	<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	
			2007 Apr 16	Sputum	23833				JQ691062	<i>Pseudallescheria minutispora</i>	
			2007 Jun 20	Sputum	23835				JQ691063	<i>Pseudallescheria minutispora</i>	
P15	F	Caen (West)	2006 Apr 14	NA	23567	JQ690915	JQ691078	JQ690968	JQ691021	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P16	F	Tours (West)	1998 Aug 11	Sputum	14766	JQ690916	JQ691079	JQ690969	JQ691022	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
P17	F	Giens (South)	1998 Oct 26	Sputum	15458	JQ690917	JQ691080	JQ690970	JQ691023	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	
P18	M	Giens (South)	1998 Sep 22	Sputum	15150	JQ690918	JQ691081	JQ690971	JQ691024	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
P19	F	Tours (West)	1998 Feb 16	Sputum	14361	JQ690919	JQ691082	JQ690972	JQ691025	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P20	M	Angers (West)	2007 May 09	Sputum	23574	JQ690920	JQ691083	JQ690973	JQ691026	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P21	M	Giens (South)	2007 Jul 17	Sputum	23575	JQ690921	JQ691084	JQ690974	JQ691027	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P22	F	Giens (South)	1998 Nov 09	Sputum	15466	JQ690922	JQ691085	JQ690975	JQ691028	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P23	F	Angers (West)	2002 Apr 26	Sputum	40203780/1 <sup>§</sup>	JQ690923	JQ691086	JQ690976	JQ691029	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P24	M	Paris (North)	2002 Apr 22	Sputum	23576	JQ690924	JQ691087	JQ690977	JQ691030	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
P25	F	Giens (West)	2002 Dec 16	Sputum	23573	JQ690925	JQ691088	JQ690978	JQ691031	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P26	F	Paris (North)	2003 Jan 23	Sputum	23577	JQ690926	JQ691089	JQ690979	JQ691032	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
P27	F	Angers (West)	1991 Oct 02	NA	13939	JQ690927	JQ691090	JQ690980	JQ691033	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P28	M	Angers (West)	1991	Sputum	13940	JQ690928	JQ691091	JQ690981	JQ691034	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
P29	M	Giens (South)	1992 Jun 15	LCR	13942	JQ690929	JQ691092	JQ690982	JQ691035	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
P30	F	Angers (West)	2000 Jan 19	Sputum	4000584 <sup>§</sup>	JQ690930	JQ691093	JQ690983	JQ691036	<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	
P31	F	Tours (West)	2008 May 06	Sputum	23578	JQ690931	JQ691094	JQ690984	JQ691037	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	
P32	M	Giens (South)	2008 Apr 07	Sputum	23579	JQ690932	JQ691095	JQ690985	JQ691038	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P33	F	Le Mans (West)	2004 Nov 25	Sputum	40409333 <sup>§</sup>	JQ690933	JQ691096	JQ690986	JQ691039	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P34	M	Toulouse (South)	2008 May 06	Sputum	23580	JQ690934	JQ691097	JQ690987	JQ691040	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
P35	F	Toulouse (South)	2008 Mar 13	Sputum	080331879/1 <sup>§</sup>	JQ690935	JQ691098	JQ690988	JQ691041	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P36	M	Rouen (North)	2007 Jan 26	Sputum	100353188/1 <sup>§</sup>	JQ690936	JQ691099	JQ690989	JQ691042	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
P37	M	Rouen (North)	2008 Nov 13	Sputum	80677953/1 <sup>§</sup>	JQ690937	JQ691100	JQ690990	JQ691043	<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	
P38	M	Rouen (North)	2007 Jul 18	Sputum	100353192/1 <sup>§</sup>	JQ690938	JQ691101	JQ690991	JQ691044	<i>Scedosporium aurantiacum</i>	
P39	F	Toulouse (South)	2008 Jun 04	Sputum	23581	JQ690939	JQ691102	JQ690992	JQ691045	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P40	F	Giens (South)	2009 Apr 17	Bronchial aspiration	23828	JQ690940	JQ691103	JQ690993	JQ691046	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P41	M	Giens (South)	2009 Jul 21	Sputum	23824	JQ690941	JQ691104	JQ690994	JQ691047	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
P42	M	Giens (South)	2004 Nov 09	Sputum	23825	JQ690942	JQ691105	JQ690995	JQ691048	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P43	M	Giens (South)	2008 Sep 03	Bronchial aspiration	23832	JQ690943	JQ691106	JQ690996	JQ691049	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P44	M	Angers (West)	2009 Nov 26	Sputum	23826	JQ690944	JQ691107	JQ690997	JQ691050	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P45	F	Angers (West)	2003 May 06	Sputum	23837	JQ690945	JQ691108	JQ690998	JQ691051	<i>Pseudallescheria minutispora</i>	
P46	M	Giens (South)	2010 Feb 17	Sputum	23836	JQ690946	JQ691109	JQ690999	JQ691052	<i>Scedosporium apiospermum</i>	
P47	M	Angers (West)	2008 Apr 04	Sputum	23834	JQ690947	JQ691110	JQ691000	JQ691053	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P48	M	Giens (South)	2010 Feb 24	Sputum	24419	JQ690948	JQ691111	JQ691001	JQ691054	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P49	M	Rouen (North)	2004 Jul 31	Bronchial aspiration	23827	JQ690949	JQ691112	JQ691002	JQ691055	<i>Pseudallescheria boydii</i>	
P50	F	Grenoble (South)	2008 Nov 25	Sputum	23829	JQ690950	JQ691113	JQ691003	JQ691056	<i>Scedosporium apiospermum</i>	

\*IHEM, Institute of Hygiene and Epidemiology-Mycology section; ITS, Internal transcribed spacer regions 1 and 2; CAL, fragment of calmodulin gene; BT2 and TUB, two regions within  $\beta$ -tubulin gene

<sup>†</sup> Isolates used for patients P3 and P14 for the distribution study and RAPD experiments, whereas all other isolates from these two patients were analyzed by RAPD only

<sup>‡</sup> Not preserved isolates

<sup>§</sup> Isolates preserved only in our laboratory

### *Genomic DNA extraction*

Mycelium was harvested from ten-day-old cultures in YPD broth (50 mL) and ground in liquid nitrogen with a mortar and pestle. DNA was recovered using the DNeasy Plant minikit (Qiagen Inc., Valencia, CA) protocol with minor modifications as described before [9]. DNA concentration was determined using a Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop technologies Inc, Wilmington, DE) at 260 nm.

### *Identification of Pseudallescheria / Scedosporium species*

Molecular analysis was performed as described by Gilgado *et al.* [17]. Four DNA regions (internal transcribed spacer regions 1 and 2, ITS; a fragment of calmodulin gene, CAL; and two regions within the  $\beta$ -tubulin gene, BT2 and TUB) were amplified. Final products were purified using the NucleoSpin® extract II kit (Macherey-Nagel GmbH & Co., Hoerd, France) and commercially sequenced in both directions. All the obtained sequences were deposited in the Genbank database under accession numbers indicated in Table 1.

### *Phylogenetic analysis*

Sequences were aligned using the ClustalW algorithm followed by manual adjustments with a text editor. Evolutionary analyses were conducted in MEGA5 by using the Maximum Likelihood (ML) method based on the Tamura-Nei model [20,21]. Initial trees for the heuristic search were obtained automatically as follows. When the number of the common sites was < 100 or less than one fourth of the total number of sites, the maximum parsimony method was used, otherwise BIONJ method with Maximum Composite Likelihood (MCL) distance matrix was used. Support of internal branches was assessed using a 500 bootstrapped data set. *Scedosporium prolificans* (FMR 7294) and *Pseudallescheria africana* (CBS 311.72) were chosen as outgroup. There were a total of 1971 positions in the final dataset; all positions containing gaps and missing data were eliminated.

### *Statistical analysis*

A Multiple Correspondence Factor Analysis (MCFA), statistical technique adequate for cross-sectional studies of descriptive and explanatory nature [22,23], was used to evaluate the association between the variables considered and shown in Table 1 (sex, geographical setting and species identified within the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex). An Agglomerative Hierarchical Clustering (AHC) technique was then applied. A dendrogram was

established to determine the number of classes, and specific characteristics of each class were defined. A *P* value of  $\leq 0.01$  was considered significant.

#### *RAPD analysis*

The primers GC 70, UBC 701 and UBC 703, described previously as the most discriminating for the *P. boydii* / *S. apiospermum* species complex, were used in this study [24]. PCR mixture (25  $\mu$ L) contained 75 ng of fungal DNA template and consisted of 1.5 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega Corporation, Charbonnières-les-Bains, France), 0.2 mM of each deoxyribonucleotide triphosphate (Eurogentec France SASU, Angers, France), 5 pmol of primer and 1 U of Taq DNA Polymerase (Roche Diagnostics, Meylan, France). Amplifications were performed with a MJ Mini Gradient Thermal Cycler (Bio-Rad Laboratories Inc., Marnes La Coquette, France) programmed as follows: initial denaturation at 94°C for 4 min; 40 cycles of 94°C for 1 min, 36°C for 1 min and 72°C for 2 min; and final extension at 72°C for 5 min. The amplified products were separated by electrophoresis on 1.5% agarose gels. Results were analyzed by visual inspection of the gel.

#### *Definition*

A patient was considered chronically colonized when the same fungal genotype was recovered by culture from at least three distinct clinical samples collected over a period of more than six months.

## **Results**

#### *Distribution of the different species of the P. boydii / S. apiospermum complex in French CF patients*

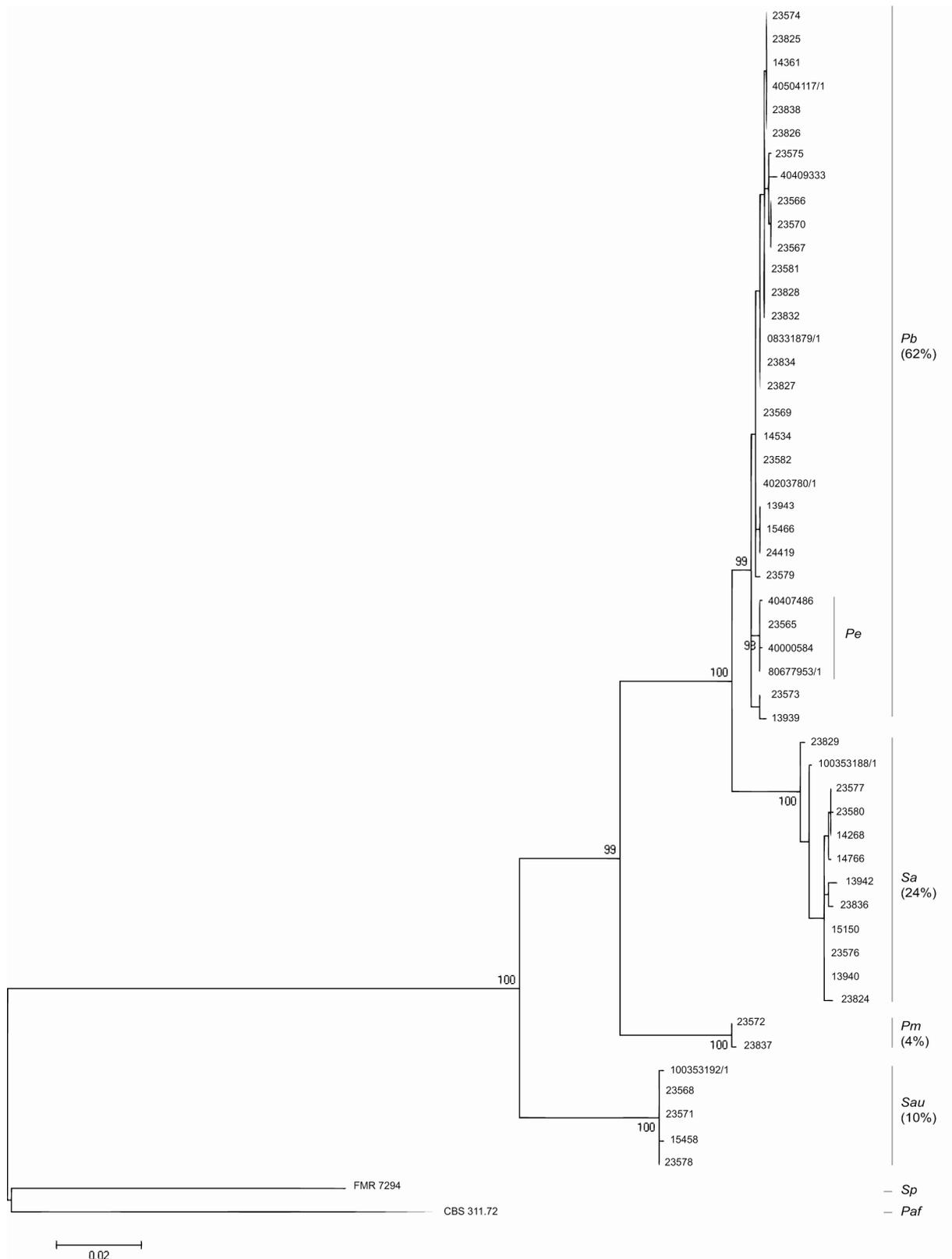
Distribution of the different species of the *Pseudallescheria* / *Scedosporium* complex in CF context in France was investigated retrospectively by the analysis of 50 epidemiologically unrelated isolates collected from an equal number of patients. Table 1 summarizes geographical setting of the studied patients. They were followed-up in different hospitals mainly located in Western France (23 patients in Angers, Caen, Le Mans, Tours and Vannes) and in the South of the country (20 patients in Giens, Grenoble and Toulouse). The TUB sequences, corresponding to a fragment of the  $\beta$ -tubulin gene (exons 5 and 6), were analyzed by individual BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) searches using NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST database. 99-100% sequence similarity to isolates analysed by Gilgado *et al.* in their phylogenetic studies, *i.e.*, FMR 8630

(accession no. AJ890133.1), FMR 4072 (accession no. AJ890122.1), FMR 8535 (accession no. AJ890014.1), FMR 8537 (accession no. AJ890110.1) and FMR 7884 (accession no. AJ890126.1), was used to identify our isolates as *S. aurantiacum*, *P. minutispora*, *S. apiospermum*, *P. boydii* and *P. ellipsoidea*, respectively (Table 1) [17]. Phylogenetic analysis based on the sequences of the four loci previously described by Gilgado *et al.* delineated four major clusters consistent with *S. aurantiacum*, *P. minutispora*, *S. apiospermum* and *P. boydii* (Table 1 and Fig. 1) [17].

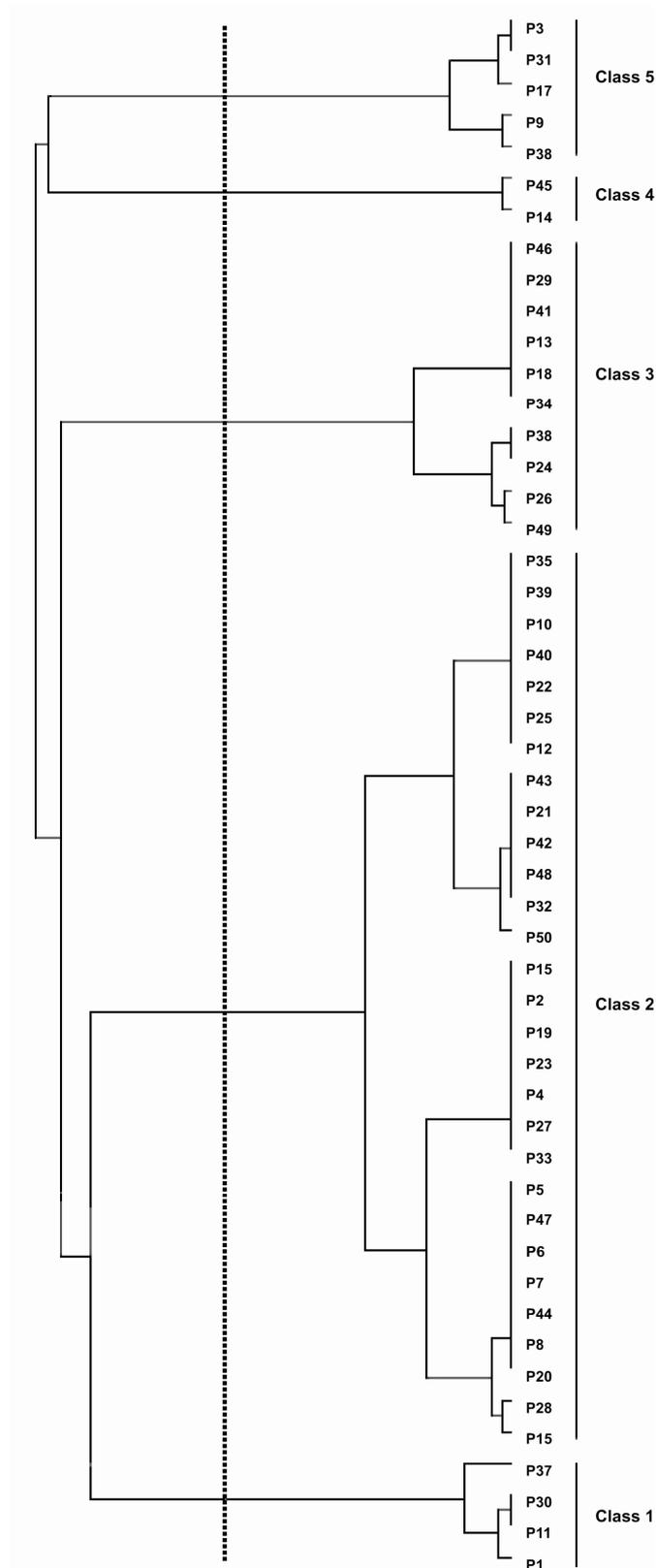
*Scedosporium aurantiacum* and *P. minutispora* were more densely grouped than the two other clusters. *Pseudallescheria boydii* showed the highest intraspecies sequence variation. Within *P. boydii* cluster, only isolates belonging to *Pseudallescheria ellipsoidea* subgroup were clearly identified and grouped with a bootstrap support of 98%.

*Pseudallescheria boydii* accounted for 62% of the studied isolates, *S. apiospermum* for 24% and *S. aurantiacum* for 10%. *Pseudallescheria minutispora* was isolated from 2 patients only (4%) and *S. dehoogii* was not identified.

The statistical analysis was conducted using MCFA followed by AHC. Thus, patients were grouped into five different classes among a tree-like structure (Fig. 2), according to their proximity, *i.e.* their similar features (sex, geographical setting and species identified within the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex). A final consolidation step was realized using the k-means method. Only minor changes were observed after consolidation. The number of classes remained unchanged; however patients P28 and P50, initially present in class 2, were reassigned to class 3. Table 2 summarizes class characteristics in the model in term of relative frequency. The variable "species" contributed predominantly to each class: it delineated 3 out of the 5 classes alone. Thus, classes 1, 4 and 5 were characterized by *P. ellipsoidea* subgroup, *P. minutispora* and *S. aurantiacum*, respectively. Class 2 was defined by *P. boydii* subgroups other than *P. ellipsoidea* and negatively associated to localization of the patients in Northern France, whereas class 3 was characterized by *S. apiospermum* and negatively associated to the West of France. Finally, sex was a non-informative variable.



**Fig. 1** Molecular phylogenetic analysis by Maximum Likelihood method. The tree with the highest log likelihood is shown. Bootstrap support values above 90% are indicated at the node. The tree is drawn to scale, with branch lengths measured in the number of substitutions per site. *Scedosporium prolificans* and *Pseudallescheria africana* were used as outgroups. Frequency of the species in this study is indicated in brackets. *Pb*, *P. boydii*; *Pe*, *P. ellipsoidea*; *Sa*, *S. apiospermum*; *Pm*, *P. minutispora*; *Sau*, *S. aurantiacum*; *Sp*, *S. prolificans*; *Paf*, *P. africana*.



**Fig. 2** Hierarchical tree of 50 CF French patients revealed by Agglomerative Hierarchical Clustering (before consolidation). The hierarchical tree shows the substructure of the population studied according to traits analyzed (sex, geographical setting and species identified within the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex). The dashed line marks the level the truncation was carried out. Five classes were observed after truncation.

**Table 2** Features distribution of French CF patients obtained by the consolidated clustering analysis.

Variable	Total sampling (n = 50)	Class 1 (n = 4)	Class 2 (n = 27)	Class 3 (n = 12)	Class 4 (n = 2)	Class 5 (n = 5)
<b>Species</b>						
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	10%	0%	0%	0%	0%	<b>100%</b>
<i>Pseudallescheria minutispora</i>	4%	0%	0%	0%	<b>100%</b>	0%
<i>Scedosporium apiospermum</i>	24%	0%	3.7%	<b>91.67%</b>	0%	0%
<i>Pseudallescheria boydii</i>						
<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	8%	<b>100%</b>	0%	0%	0%	0%
Other subgroups	54%	0%	<b>96.3%</b>	8.33%	0%	0%
<b>Sex</b>						
Male	52%	50%	44.4%	83.33%	50%	20%
Female	48%	50%	55.6%	16.67%	50%	80%
<b>Geographical setting</b>						
West	46%	75%	55.6%	<b>8.33%</b>	100%	40%
South	40%	0%	44.4%	58.33%	0%	20%
North	14%	25%	<b>0%</b>	33.34%	0%	40%

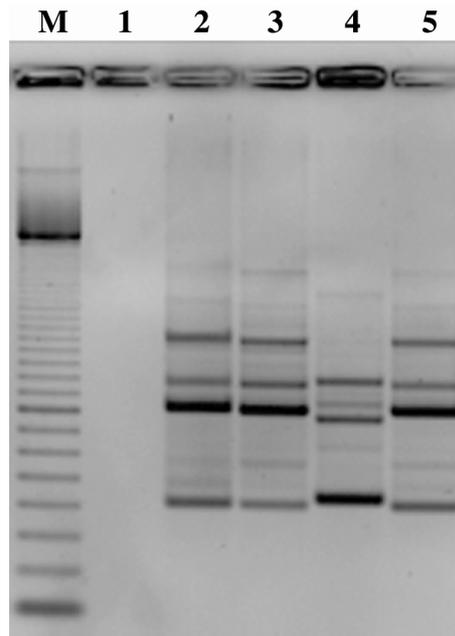
\*In bold are indicated the characteristics positively associated with the classes ( $p \leq 0.01$ ) and in bold and italic, the characteristics negatively associated with the classes ( $p \leq 0.01$ ).

### Capability of the different species to establish a chronic colonization

Previous studies from our group together with molecular identification of studied isolates demonstrated the capability of *P. boydii* and *S. apiospermum* to establish a chronic colonization of the airways [17,24]. Therefore, here we focused our attention on *P. minutispora* and *S. aurantiacum*. The three-primer set GC 70, UBC 701 and UBC 703 was chosen to obtain RAPD profiles from multiple and/or sequential isolates recovered from sputum samples collected from patients P3 and P14.

For patient P14, four sequential isolates over a 15-month period were analyzed. Figure 3 illustrates the results obtained with primer UBC 701, and Table 3 presents an overview of the results. Two different genotypes were identified and designated overall RAPD types 1 and 2. Analysis of TUB sequences indicated that overall RAPD type 1 corresponded to *P. minutispora* species and overall RAPD type 2 to *P. ellipsoidea* (Table 3). The same genotype of *P. minutispora* was recurrently isolated, suggesting that it was responsible for a chronic colonization of the airways in this patient.

For patient P3, a total of 16 sequential and/or multiple isolates, collected over a 5-year period, were analyzed (Table 3). Six genotypes were observed, that sequencing data allowed to identify as *S. aurantiacum* and *P. boydii*. A predominant genotype (overall RAPD type 6 – *S. aurantiacum*) was observed over a 2.5-year period, accompanied by two other genotypes corresponding to the same species (overall RAPD type 7) or to *P. boydii* (overall RAPD type 8). Collectively, these results demonstrated that *S. aurantiacum* is also capable to chronically colonize the respiratory tract of CF patients.



**Fig. 3** RAPD pattern (primer UBC 701) of isolates collected from patient P14. Lanes 1 to 5, negative control, isolates 23572, 23830, 23833 and 23835, respectively; lane M, DNA size markers (100-bp ladder from Amersham Pharmacia-Biotech).

**Table 3** RAPD types and molecular identification of studied isolates collected from patients P3 and P14.

Patient	Sampling date	IHEM no.	RAPD type			Overall RAPD type	Molecular identification
			GC70	UBC701	UBC703		
3	2002 Sep 02	25301	3	3	3	3	
		23061	3	3	3	3	<i>Pseudallescheria boydii</i>
	2003 Jun 18	23070	4	4	4	4	<i>Pseudallescheria boydii</i>
	2003 Oct 31	25300	3	3	3	3	
	2003 Dec 18	23068	5	5	5	5	<i>Scedosporium aurantiacum</i>
	2004 Dec 01	23069	5	6	6	6	
		40409383/2 <sup>†</sup>	5	6	6	6	
		40409383/3 <sup>†</sup>	5	6	6	6	
	2005 May 23	23568	5	7	5	7	<i>Scedosporium aurantiacum</i>
	2005 Oct 03	23080	5	6	6	6	<i>Scedosporium aurantiacum</i>
		23081	5	6	6	6	
		23082	3	3	7	8	<i>Pseudallescheria boydii</i>
	2006 Aug 03	23092	5	6	6	6	
23094		5	6	6	6		
2007 Jun 06	25299	5	6	6	6		
	25298	5	6	6	6		
14	2006 Mar 08	23572	1	1	1	1	<i>Pseudallescheria minutispora</i>
	2006 Jun 09	23830	2	2	2	2	<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>
	2007 Apr 16	23833	1	1	1	1	<i>Pseudallescheria minutispora</i>
	2007 Jun 20	23835	1	1	1	1	<i>Pseudallescheria minutispora</i>

\*IHEM, Institute of Hygiene and Epidemiology-Mycology section

<sup>†</sup>Not preserved isolates

## Discussion

As various new sibling species with differences in their susceptibility to antifungals have been described recently within the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex, their respective prevalence, epidemiology and pathogenicity remain to be elucidated [11,12,17,18]. In an earlier report, our group showed that behind *A. fumigatus*, the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex ranks the second among the filamentous fungi colonizing the airways of CF patients [14]. Therefore, this study was undertaken to specify the distribution of these species in the CF context.

Until now, three species of the complex, *i.e.* *S. aurantiacum*, *S. apiospermum* and *P. boydii*, have been described associated to CF [15,19,25]. *Pseudallescheria minutispora* was reported once in this context by Lu *et al.* [26]. In this study, the fungus was detected from only one of the sputum samples analyzed. More, it was not recovered by mycological examination of the sample, but exclusively detected by reverse line blot hybridization (RLB) following PCR amplification of BT2 region of the  $\beta$ -tubulin gene. Therefore, it cannot be established whether a real colonization by this fungus has occurred in the respiratory tract of the patient. In this study, we report for the first time the colonization of the airways by *P. minutispora* in CF patients.

Although *P. boydii* and *S. apiospermum* were the most frequent species isolated, the distribution of the sibling species in our study differed significantly from the results published by Kaltseis *et al.* on environmental (from Austria and The Netherlands) and clinical isolates (179, all diseases combined) collected in Robert Koch Institute (Berlin, Germany) and the Centraalbureau for Schimmelcultures (CBS, Utrecht, The Netherlands) [19]. In the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex, these authors reported that *P. boydii* accounted for 1.9-2.3% of environmental isolates and for 33.5% of their clinical isolates, thus contrasting with the high prevalence (62%) we found in CF context [19]. Likewise, *S. apiospermum* was the most frequent species of the complex encountered in the environment (58.7-77%) whereas it represented only 24% of our isolates collected from our patients. This discrepancy in species distribution between the environment and the CF lungs was even more pronounced regarding *S. dehoogii*, which was relatively common in soil (13.8-28.8%), but never detected in human and particularly from respiratory secretions of CF patients. Conversely, similar abundance of *S. aurantiacum* was found in environmental samples (4.8-7.7%) and here associated with CF (10%). An experimental study in a murine model prevents one to explain variations in species distribution by differences in their virulence,

*S. aurantiacum* and *S. dehoogii* being the most virulent species, and *P. minutispora* and *P. boydii* the less ones [11]. *Pseudallescheria boydii*, one of the less virulent species and of the less abundant in the environment, was the most frequent in the CF context. These conflicting results may be explained by the various geographic origins of the studied isolates (Germany, Austria and The Netherlands versus France). Multiple correspondence factor analysis provided an integrated visualization of population structure in the CF context. Variations in species distribution were strengthened when we considered the geographical setting of the patients. Indeed, *P. boydii* was rarely encountered in Northern France, while *S. apiospermum* was less represented in the West of the country. Our sampling size limits the generalizability of these results, and the imbalanced classes defined using MCFA and clustering studies do not allow us to infer causality between variables. However, data from Australia support further the influence of geographical setting [15]. In this country, the abundance of *S. aurantiacum* and, to a lesser extent, of *S. prolificans* in the environment was in agreement with their respective prevalence as causative agents of airway colonization in CF patients. Further survey combining precise identification of both environmental and clinical isolates is required for a better understanding of the epidemiology of airway colonization and of the pathogenic mechanisms of these fungi. Nevertheless, as mentioned above, colonization with *P. boydii* is particularly common in CF patients; this species might be able to establish more easily in lungs of patients with defective respiratory function and to evade the host's immune defense. The reasons for the higher prevalence of *P. boydii* in CF remain to be investigated. For instance, the respective virulence of the sibling species of the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex should be evaluated using CFTR mice.

We used RAPD to investigate the colonization pattern in two of the patients (P3 and P14). RAPD is easy-to-perform, rapid and requires small quantity of nucleic acid. Furthermore, neither knowledge of molecular biology of the species being studied nor particular sequence information is necessary. Although it has limited inter-laboratory reproducibility, this method has been widely used to delineate medically important fungi [27]. For the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex, the capacity of *P. boydii* and *S. apiospermum* to chronically colonize the airways of CF patients was previously reported [24]. In this report, we also demonstrated the capacity of two other species of the complex, *i.e.* *S. aurantiacum* and *P. minutispora*, to chronically colonize the respiratory tract of CF patients. The mycological survey of patients P3 and P14 resulted in nine and four positive sputum samples (corresponding to 16 and four isolates), respectively. For Patient P14, two genotypes were identified, including one of *P. boydii* found transiently. A recurrent genotype, corresponding

to *P. minutispora*, was recovered over the sampling period (15 months). Patient P3 was colonized by two different species, at first *P. boydii* and then *S. aurantiacum*. Regarding *S. aurantiacum*, several closely related genotypes were identified, but one of them was found regularly and predominantly. An explanation could be the eradication of the *P. boydii* genotype by the antifungal treatments, followed by a new infestation by *S. aurantiacum* which is known to be even less susceptible to antifungal drugs.

As *P. boydii* and *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* and *P. minutispora* are able to chronically colonize the airways of CF patients. Although they are all weakly susceptible to almost all currently available antifungal drugs, species of the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex differ in their antifungal susceptibility profile [25,28]. The optimum treatment should be species-specific. Therefore, prevention is even more important than in other fungal infections, and molecular typing of a large set of environmental and clinical isolates will help us to delineate the epidemiology of each the sibling species of the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex.

## Acknowledgments

The authors acknowledge Vincent Cattoir (Caen), Jacqueline Carrère (Giens), Claudine Pinel (Grenoble), Elisabeth Boyer (Le Mans), Laurence Delhaes (Lille), Svetlana Challier (Paris), Loïc Favennec (Rouen), Sophie Cassaing (Toulouse), Eric Bailly (Tours) and Pascal Pouedras (Vannes) who provided some of the studied isolates.

**Declaration of interest:** The authors report no conflicts of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

This work was supported in part by a grant from the Institut de Parasitologie de l'Ouest (Rennes, France).

## References

1. Bellis G, Cazes MH, Parant A, *et al.* Cystic fibrosis mortality trends in France. *J Cyst Fibros* 2007; **6**: 179-186.
2. Girodon E, Cazeneuve C, Lebagy F, *et al.* CFTR gene mutations in adults with disseminated bronchiectasis. *Eur J Hum Genet* 1997; **5**: 149-155.
3. Bobadilla JL, Macek M, Jr., Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002; **19**: 575-606.

4. Saiman L. Infection prevention and control in cystic fibrosis. *Curr Opin Infect Dis* 2011; **24**: 390-395.
5. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest* 2010; **137**: 171-176.
6. Pihet M, Carrere J, Cimon B, *et al.* Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis - a review. *Med Mycol* 2009; **47**: 387-397.
7. Lebecque P, Leonard A, Huang D, *et al.* *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* and cystic fibrosis - Prevalence and risk factors. *Med Mycol* 2010; **48** (Suppl 1): S4-9.
8. Barton RC, Borman AM, Johnson EM, *et al.* Isolation of the fungus *Geosmithia argillacea* in sputum of people with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2010; **48**(7): 2615-2617.
9. Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, *et al.* *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2010; **48**: 2381-2386.
10. Houbraken J, Spierenburg H, Frisvad JC. *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2012; **101**: 403-421.
11. Gilgado F, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J. Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med Mycol* 2009; **47**: 371-374.
12. Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, *et al.* Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob Agents Chemother* 2012; **56**: 2635-2642.
13. Husain S, Muñoz P, Forrest G, *et al.* Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* in transplant recipients: clinical characteristics and impact of antifungal agent therapy on outcome. *Clin Infect Dis* 2005; **40**: 89-99.
14. Cimon B, Carrère J, Vinatier J, *et al.* Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; **19**: 53-56.
15. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, *et al.* Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med Mycol* 2010; **48** (Suppl 1): S37-44.
16. Heath CH, Slavin MA, Sorrell TC, *et al.* Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin Microbiol Infect* 2009; **15**: 689-693.
17. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* 2005; **43**: 4930-4942.
18. Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton D, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol* 2008; **46**: 766-771.

19. Kaltseis J, Rainer J, de Hoog G. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol* 2009; **47**: 398-405.
20. Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol Biol Evol* 2011; **28**: 2731-2739.
21. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol* 1993; **10**: 512-526.
22. Benzecri JP, Gopalan TK. *Correspondence analysis handbook*, New York: Marcel Dekker, 1991.
23. Escofier B, Pages J. Multiple factor-analysis (AFMULT package). *Computational Statistics & Data Analysis* 1994; **18**: 121-140.
24. Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, *et al.* Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2002; **40**: 2108-2114.
25. Lackner M, Rezusta A, Villuendas MC, *et al.* Infection and colonisation due to *Scedosporium* in Northern Spain. An in vitro antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates. *Mycoses* 2011; **54** (Suppl 3): 12-21.
26. Lu Q, Gerrits van den Ende AH, Bakkers JM, *et al.* Identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species by three molecular methods. *J Clin Microbiol* 2011; **49**: 960-967.
27. Harun A, Perdomo H, Gilgado F, *et al.* Genotyping of *Scedosporium* species: a review of molecular approaches. *Med Mycol* 2009; **47**: 406-14.
28. Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2006; **50**: 4211-4213.

## Introduction de l'étude 2

La distribution des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* dans le contexte de la mucoviscidose, et en clinique en général, variant selon les pays, nous nous sommes proposés d'étudier la distribution environnementale de ces espèces dans les environs d'Angers et la région Pays-de-la-Loire.

119 échantillons de sol ont été collectés dans 11 biotopes différemment impactés par les activités humaines. Des habitats naturels préservés de ces activités ont été explorés : deux forêts d'arbres à feuilles caduques, l'une d'entre elles comportant aussi des conifères, et des berges de rivière, sablonneuses en bord de Loire et vaseuses en bord de Mayenne. Des prélèvements de sol ont aussi été collectés dans des zones fortement impactées par les activités humaines : des plages, des vignes, des zones agricoles, des parcs citadins, des aires de jeux, des zones industrielles et des boues récupérées dans des stations d'épuration des eaux usées. La flore microbienne des échantillons de sol a été analysée par culture à l'aide du milieu non-sélectif YPDA (additionné de chloramphénicol) incubé à 25°C et à 37°C et du milieu semi-sélectif Scedo-Select III incubé à 37°C, milieu développé pour la détection spécifique des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. Toutes les colonies obtenues ont été décrites macroscopiquement et identifiées par leurs caractéristiques microscopiques. Celles appartenant au complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* ont été comptées, puis ré-isolées sur milieu de culture YPDA additionné de cycloheximide et sur milieu Scedo-Select III. Les colonies ainsi purifiées ont été identifiées au rang d'espèce par spectrométrie de masse MALDI-TOF et/ou par identification moléculaire (fragment TUB du gène de la  $\beta$ -tubuline).

Nous avons identifié 26 genres de champignons filamenteux, sept espèces appartenant au genre *Aspergillus*, des levures et des algues unicellulaires. L'association précédemment décrite des espèces *Mortierella* et *Penicillium* et des zones forestières, et celle existant entre *A. niger* et les zones viticoles ont été confirmées dans notre étude.

Aucun membre du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* n'a été détectée dans les 20 échantillons réalisés en forêt alors que 92% de ceux collectés dans les zones agricoles ont révélé leur présence. De 40% à 60% des prélèvements réalisés sur les berges de rivières, dans les parcs citadins, les aires de jeux, les zones industrielles et les boues de stations d'épuration se sont avérés positifs pour ce complexe. Il a été mis en évidence pour un tiers

des échantillons réalisés sur les plages. Seuls les deux prélèvements non amendés collectés en zone viticole étaient positifs en culture pour ce complexe. L'analyse statistique menée pour évaluer les associations entre les différents biotopes et la flore microbienne en présence organisée en huit groupes (Mucorales, genre *Aspergillus*, champignons filamenteux hyalins arborant des phialides hors *Aspergillus*, complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, autres champignons filamenteux hyalins, dématiés, levures et algues unicellulaires) les a divisé en cinq classes. La classe 1 (forêts) était caractérisée par l'absence du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* alors que la classe 4 (zones agricoles) par sa présence.

Les densités les plus importantes d'espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* ont été retrouvées dans les zones agricoles, les boues de stations d'épuration et les aires de jeux, alors que les plus faibles l'ont été dans les zones viticoles et celles en contact avec de l'eau (berges de rivières et plages). Ceci est en accord avec les résultats précédemment obtenus en Autriche et en Australie (Kaltseis *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2010).

Le complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* a été isolé de sols présentant un pH de 4,9 à 8,5. Or, le fait que la plupart des sols positifs en culture pour ce complexe avaient un pH de 6,1 à 7,9 confirme que ce paramètre exerce une influence sur sa présence, comme cela avait été mis en évidence par Kaltseis et ses collaborateurs (2009).

Dans notre étude, *S. dehoogii* était l'espèce du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* la plus abondante (n = 102) alors que *P. minutispora* n'a été isolée qu'une seule fois dans une aire de jeux. Des quantités équivalentes de *S. aurantiacum* (n = 56), *P. boydii* (n = 51) et *S. apiospermum* (n = 49) ont été retrouvées. Cependant, la distribution de ces espèces dans les biotopes explorés était différente.

*Scedosporium aurantiacum* a été isolé de 72% des prélèvements réalisés en zone agricole, et représentait 75% des isolats du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* retrouvés dans cette zone. *Scedosporium dehoogii* a été détecté dans tous les biotopes, excepté les zones viticoles. Cette espèce était particulièrement représentée en zone agricole et dans les boues de stations d'épuration puisque 67% et 50% des échantillons réalisés dans cette zone étaient positifs pour cette espèce. De manière intéressante, *S. dehoogii* a aussi été isolé de 40% des prélèvements effectués dans les zones industrielles et représentait 70% des isolats du complexe collectés dans cette zone. *Scedosporium apiospermum*, l'espèce du complexe majoritairement isolée des aires de jeux (60% des isolats) n'a été retrouvé dans les zones au contact de l'eau (berges de rivières et plages) alors que *Pseudallescheria boydii* représentait 84% des isolats obtenus à partir des prélèvements de plage.

L'analyse statistique menée pour évaluer les associations entre les différents biotopes étudiés et les micro-organismes en présence (26 genres de champignons filamenteux, sept espèces d'*Aspergillus*, les cinq espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, les levures et les algues unicellulaires) a divisé ces biotopes en huit classes. La classe 2 (zones viticoles) était caractérisée par l'absence de *S. dehoogii*, la classe 5 (aires de jeux) par la présence de *S. apiospermum* et la classe 7 (zones agricoles) par celles de *S. aurantiacum* et *S. dehoogii*.

## ETUDE 2 : Ecologie des différentes espèces du complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* en France

### Manuscrit soumis pour publication

Amandine Rougeron,<sup>1,2</sup> Gaëlle Schuliar,<sup>1</sup> Julie Leto,<sup>3</sup> David Landry,<sup>4</sup> Marie-Elisabeth Bougnoux,<sup>3</sup> Abdessamad Kobi,<sup>5</sup> Jean-Philippe Bouchara<sup>1,2</sup> and Sandrine Giraud<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>LUNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, EA 3142, Angers, France.

<sup>2</sup>Centre Hospitalier Universitaire, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Angers, France.

<sup>3</sup>Université Paris Descartes, Service de Microbiologie, Centre d'Infectiologie, Necker-Pasteur, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

<sup>4</sup>LUNAM Université, Université d'Angers, Laboratoire LETG-Angers LEESA, UMR 6554 CNRS, Angers, France.

<sup>5</sup>LUNAM Université, Université d'Angers, Laboratoire en sûreté de fonctionnement qualité et organisation, EA 3858, Angers, France.

Les espèces du complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* sont des champignons pathogènes émergents capables de coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Comme dans une précédente étude, *P. boydii* a été plus fréquemment retrouvée dans ce contexte en France que dans les autres pays européens, cette étude a été menée dans le but de spécifier et caractériser l'habitat naturel des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* dans notre pays. Les densités les plus importantes d'isolats de ce complexe ont été retrouvées dans les zones impactées par les activités humaines, à savoir les zones agricoles, les fluides collectées dans des stations d'épuration des eaux usées, les aires de jeux et les zones industrielles. Aucun isolat de ce complexe n'a été retrouvé dans les habitats naturels. La plupart des échantillons de sol positifs pour les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* par culture présentaient un pH allant de 6 à 8. *Scedosporium dehoogii*, l'espèce la plus abondante (n = 102), a été détectée dans toutes les zones impactées par les activités humaines à l'exception des vignes, alors que *Scedosporium aurantiacum* (n = 56) a été principalement retrouvée dans les zones agricoles. *Pseudallescheria boydii* (n = 51) et *S. apiospermum* (n = 49) ont été majoritairement isolées des bords de mer et des aires de jeux, respectivement. *Pseudallescheria minutispora* n'a été trouvée qu'une seule fois d'une aire de jeux. Cette étude révèle de potentielles sources de contamination des patients, en particulier dans le contexte de la mucoviscidose.

# Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* species complex

Amandine Rougeron,<sup>1,2</sup> Gaëlle Schuliar,<sup>1</sup> Julie Leto,<sup>3</sup> David Landry,<sup>4</sup> Marie-Elisabeth Bougnoux,<sup>3</sup> Abdessamad Kobi,<sup>5</sup> Jean-Philippe Bouchara<sup>1,2</sup> and Sandrine Giraud<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>LUNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, EA 3142, Angers, France.

<sup>2</sup>Centre Hospitalier Universitaire, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Angers, France.

<sup>3</sup>Université Paris Descartes, Service de Microbiologie, Centre d'Infectiologie, Necker-Pasteur, Hôpital Necker-Enfants Malades, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, Paris, France.

<sup>4</sup>LUNAM Université, Université d'Angers, Laboratoire LETG-Angers LEESA, UMR 6554 CNRS, Angers, France.

<sup>5</sup>LUNAM Université, Université d'Angers, Laboratoire en sûreté de fonctionnement qualité et organisation, EA 3858, Angers, France.

**Species of the *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* complex (PSC) are emerging fungal pathogens able to chronically colonize the airways of patients with cystic fibrosis (CF). As *P. boydii* was found more frequently colonizing the lungs of CF patients in France than in other European countries in a previous report, the present study was conducted in order to specify and to characterize the natural habitat of PSC species in our country. The highest densities of PSC isolates were found in human-impacted areas, *i.e.* agricultural areas, fluids obtained from wastewater treatment plants, playgrounds and industrial areas. No PSC isolates were recovered from natural habitats. Most PSC culture-positive soil samples exhibited a pH range of 6 to 8. *Scedosporium dehoogii*, the most abundant species (n = 102), was detected in all human-impacted area types except vineyards, whereas *Scedosporium aurantiacum* (n = 56) was mostly found in agricultural areas. *Pseudallescheria boydii* (n = 51) and *S. apiospermum* (n = 49) were predominantly isolated from seashores and playgrounds, respectively. *Pseudallescheria minutispora* was found only once from a playground. This study highlights potential sources of contamination of the patients, especially in the CF context.**

A. Rougeron, G. Schuliar, J.P. Bouchara and S. Giraud are members of the ECMM/ISHAM Working group on *Pseudallescheria* / *Scedosporium* infections. This study was presented in part during the 4th meeting of the ECMM/ISHAM Working group on *Pseudallescheria* / *Scedosporium* infections that was held in Innsbruck, Austria, on May, 16-18, 2013.

\*For correspondence: Sandrine Giraud, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Institut de Biologie en Santé-IRIS, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers cédex 9, France. Phone: +33 (0)2 44 68 83 64; Fax: +33 (0)2 41 22 67 09; e-mail: [sandrine.giraud@univ-angers.fr](mailto:sandrine.giraud@univ-angers.fr)

## Introduction

*Scedosporium apiospermum*, initially considered the anamorph of *Pseudallescheria boydii*, is a filamentous fungus usually living in soil as a saprophyte, but capable to cause a wide variety of infections in immunocompromised as well as in immunocompetent individuals (Cortez *et al.*, 2008). In healthy people, contamination mainly occurs through traumatic inoculation of fungal elements. The basic clinical manifestations of scedosporiosis consist in localized infections, principally subcutaneous mycetoma resulting from traumatic inoculation of fungal material to exhibited body parts by thorns or splinters for instance (Guarro *et al.*, 2006). Respiratory infections, such as sinusitis or pulmonary mycetoma, may also occur through inhalation of some airborne conidia, for example in patients with pre-existing pulmonary cavities. Additionally, invasive diseases with central nervous system involvement and a high mortality rate are described as a consequence of near-drowning incidents (Panichpisal *et al.*, 2006; Katragkou *et al.*, 2007). Nevertheless, this fungus has gained attention in the past two decades mainly because of its worldwide recognition as a significant pathogen in patients with cystic fibrosis (CF). In this genetic inherited disease, the respiratory tract is often colonized by various bacteria or fungi, sometimes leading to true respiratory infections which determine the quality of life of the patients and constitute the major cause of morbidity and mortality. Several studies indicate that *S. apiospermum* usually ranks the second among the filamentous fungi colonizing the airways of patients with CF, with a frequency ranging from 3.4% to 17.4% (Cimon *et al.*, 1995, 2000; Williamson *et al.*, 2001; Heath *et al.*, 2009; Horr e *et al.*, 2009; Blyth *et al.*, 2010a, 2010b; Paugam *et al.*, 2010; Masoud-Landgraf *et al.*, 2013), and that it is able to chronically colonize the respiratory tract (Defontaine *et al.*, 2002; Zouhair *et al.*, 2013). In CF, this thermotolerant fungus may be responsible for bronchitis or allergic broncho-pulmonary aspergillosis (Cimon *et al.*, 2000; Vázquez-Tsuji *et al.*, 2006), but more important, it may cause disseminated infections in case of immunodeficiency. Especially, severe and often fatal infections are described after lung transplantation which constitutes the ultimate treatment of the patients (Morin *et al.*, 1999; Symoens *et al.*, 2006; Borghi *et al.*, 2010; Morio *et al.*, 2010; Hirschi *et al.*, 2012; Miraldi *et al.*, 2012), the fungus exhibiting a low susceptibility to all current systemic antifungals (Hennequin *et al.*, 1997; Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2007; Lackner *et al.*, 2012). In this context, defining prevention measures aiming to reduce the exposure of the patients to the fungus is particularly challenging. Nevertheless, this requires a better knowledge on the ecological niches of the fungus.

Recently, molecular data combined with physiological and biochemical studies demonstrated that *S. apiospermum* and *P. boydii* are two distinct species, and permitted the identification of three additional species. *Scedosporium apiospermum*, therefore, is now considered a species complex comprising at least five species, *i.e.* *Scedosporium aurantiacum*, *Pseudallescheria minutispora*, *Scedosporium dehoogii*, *S. apiospermum sensu stricto* and *P. boydii* (Gilgado *et al.*, 2005, 2008). A better understanding of the ecology of these sibling species is necessary to delineate the risk factors for airway colonization / respiratory infections in CF, since they differ in their *in vitro* susceptibility to antifungal drugs, as well as in their frequencies in human. Besides to be the less susceptible species to all systemic antifungals (Alastruey-Izquierdo *et al.*, 2007; Lackner *et al.*, 2012), *S. aurantiacum* is the most common species in CF within this species complex in Australia (Blyth *et al.*, 2010a), whereas other studies revealed *S. apiospermum* as the predominant species in Germany (Bernhardt *et al.*, 2013) or in Austria (Kaltseis *et al.*, 2009). These discrepancies are in agreement with differences from one country to another in the frequency of these species in the environment (Kaltseis *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2010). Recently, an epidemiological study performed on a large cohort of CF patients in France demonstrated that *P. boydii* was largely predominant in French CF patients, followed by *S. apiospermum*, *S. aurantiacum* and *P. minutispora* (Zouhair *et al.*, 2013).

Taking into account the particular distribution of the species in the CF context in France, an environmental study was conducted in order to define the frequency of each species in our country and the possible specificities of their habitat.

## Experimental procedures

### *Soil sampling*

Sampling sites were selected in 11 areas in the Pays-de-la-Loire region (France) representing various types of human activities. These included natural habitats with a low presumed human impact, *i.e.* a coniferous and deciduous forest (Forest A), a deciduous forest (Forest B), sandy riverbanks of the Loire River (Riverbanks A) and muddy riverbanks of the Mayenne River (Riverbanks B), but also strongly human-impacted areas: seashores, vineyards, agricultural areas, city parks, playgrounds, industrial areas, and fluids obtained from wastewater treatment plants (WWTP). One hundred and nineteen soil samples were collected with a single use spatula at less than 15 cm in depth after removal of weeds and/or branches from the surface and secured in plastic bags. Each sample corresponded to a mix of three different collection spots taken in a square meter of a plot.

### *pH measurement*

As 12 soil samples could not be sieved, pH was measured on the remaining 107 soil samples using a cyberscan pH 510 pH-meter (Eutech instruments). To do this, 20 g of dried and sieved (2 mm) soil sample were suspended in 50 mL of distilled water. After stirring for 10 min, the suspension was allowed to rest for 10 min before being stirred again for 10 min. The soil suspension was maintained under agitation during pH measurement. All assays were performed in triplicates and mean values were calculated. Data were divided into classes whose number was determined using the square root of the number of mean pH values. Theoretical amplitude of each class was determined by dividing the amplitude of the mean pH values by the number of classes.

### *Fungal isolation*

Fungal communities in soil samples were analyzed by plating on two distinct culture media: (i) the non-selective yeast extract-peptone-dextrose agar (containing in g/l: yeast extract, 5; peptone, 10; glucose, 20 and agar, 20) supplemented with chloramphenicol 0.5 g/l (YPDA) and (ii) the semi-selective culture medium Scedo-Select III previously developed in our lab for specific detection of the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex (PSC) (unpublished data). Inoculation was performed during the sampling day. Five grams of soil samples were vigorously mixed with 5 mL of sterile distilled water. The resulting mixture was filtered through a 100- $\mu$ m nylon mesh and the obtained filtrate was centrifuged at 4500 rpm for 5 min. Pellets were resuspended into 5 mL of sterile distilled water. Aliquots of 100  $\mu$ L were streaked onto 6 YPDA plates and 3 Scedo-Select III plates. Three of the YPDA plates were incubated at 25°C and the others at 37°C. All plates were examined daily for fungal growth.

### *Identification of fungal colonies*

All colonies were described macroscopically and examined by light microscopy after mounting on glass slides in lactic blue stain. Identification was performed according to de Hoog *et al.* (de Hoog *et al.*, 2000). Colonies identified as belonging to PSC were counted and subcultured in parallel on YPDA supplemented with 0.5% cycloheximide and Scedo-Select III to obtain pure colonies. Isolates were preserved by freeze-drying for further analysis.

Freeze-dried isolates were resuspended in 1 mL of sterilized ultra-pure water and inoculated on YPDA. After checking purity, isolates were grown in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) broth for DNA extraction and/or subcultured on YPDA for mass spectrometry analysis.

*Precise species identification of Pseudallescheria / Scedosporium isolates*

(1) Matrix assisted laser desorption ionization - time of flight (MALDI-TOF) / mass spectrometry (MS). Colony surface was scraped using a sterile swab and mixed with 1.5  $\mu$ l of formic acid (70% v/v) previously deposited on a target plate (Andromas, Paris, France). After drying the plate at room temperature, one microliter of matrix solution HCCA (saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 50% acetonitrile, 2.5% trifluoroacetic acid) was added to each well, and cocrystallized with sample. All isolates were deposited in duplicates and processed using the Andromas system (Paris, France) which comprises a mass spectrometry apparatus combined with control software and various databases for micro-organisms identification. For each sample, positive ions were extracted with an accelerating voltage of 20 kV in linear mode. The spectra were analyzed and compared over a  $m/z$  range of 3,000 to 20,000 with the Andromas software (Paris, France). All peaks with an intensity higher than 0.1 were retained and compared with spectral fingerprints in the PSC database taking into account possible variations in the  $m/z$  value of  $\pm 10 m/z$ . Acceptable identification corresponded to species having  $\geq 70\%$  of peaks in common with the reference isolates in the database. Only the first- and second-best matches were retained. A difference of at least 10% between the first and the second match was required. When the identification was not acceptable (*i.e.*  $< 70\%$  of peaks in common with those for the reference isolates or a  $< 10\%$  difference between the first and second matches), a second run was performed and the results were analyzed similarly.

(2) Molecular identification. Mycelium was harvested from seven-day-old cultures in YPD broth (10 mL) and ground in liquid nitrogen with a mortar and pestle. DNA was recovered using the DNeasy plant mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) protocol with minor modifications as described previously (Giraud *et al.*, 2010). DNA concentration was determined using a Nano-Drop spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) at 260 nm. Part of the  $\beta$ -tubulin gene was amplified using primers TUB-F and TUB-R (Cruse *et al.*, 2002), and amplicons were sequenced using commercially available sequencing services. Sequence data were compared by individual BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) searches using NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST database for identification at the species level. 97-100% sequence similarity to isolates previously analyzed by Gilgado *et al.* (Gilgado *et al.*, 2005), *i.e.* FMR 8630 (accession no. AJ890133.1), FMR 4072 (AJ890122.1), FMR 8532 (AJ890012.1), IHEM 14462 (AJ889995.1) and FMR 8537 (AJ890110.1), was used to identify 61 of our isolates as *S. aurantiacum*, *P. minutispora*, *S. dehoogii*, *S. apiospermum* and *P. boydii*, respectively. When similarity result was lower than

97%, an additional analysis was performed consisting in sequencing the internal transcribed spacer (ITS) 1 and 2 regions of nuclear rRNA genes, a portion of the calmodulin gene, and another region of the  $\beta$ -tubulin gene (BT2) as previously described (Gilgado *et al.*, 2005). All the obtained sequences were deposited in the Genbank database under the accession numbers indicated in supplemental data S1.

### *Statistical analysis*

Two Factorial Correspondence Analysis followed by an Agglomerative Hierarchical Classification (Benzécri, 1992; Greenacre, 1984) was conducted to evaluate the association between the 11 area types and micro-organisms. For the first analysis, microorganisms were divided into 8 groups (Mucorales, *Aspergillus* species, other phialide-bearing fungi, *P. boydii* / *S. apiospermum* species complex, other hyaline filamentous fungi, dematiaceous fungi, yeasts and single-celled algae), whereas all different genera or species were considered for the second analysis (*i.e.* 26 genera of filamentous fungi, 7 species belonging to the genus *Aspergillus*, the five PSC species, yeasts and single-celled algae). A dendrogram was established to determine the number of classes, and specific characteristics of each class were defined. A  $p$  value  $\leq 0.05$  was considered statistically significant.

## **Results**

In order to specify the natural habitat of PSC in France, 119 soil samples were collected from 11 area types representing various types of human activities. Table 1 summarized the fungal biota and single-celled algae recovered from these samples. Fungi the most commonly found in soil samples belonged to the Mucorales order (mainly *Mortierella* and *Mucor*), to the *Aspergillus* genus (mainly *A. fumigatus*), and to other phialide-bearing genera (especially *Penicillium* and *Fusarium*). Single-celled algae, the less frequent microorganisms, were found only in fluids collected from WWTP. Finally 36% to 47% of the soil samples were positive for other fungi, such as hyaline hyphomycetes excluding PSC, dematiaceous fungi or yeasts. PSC was isolated from 40% of the samples and distribution discrepancies were observed between the area types. No species of PSC were found from the 20 soil samples collected in forests whereas 11 out of the 12 agricultural samples (92%) revealed their presence. From 40 to 60% of samples collected from riverbanks, city parks, playgrounds, industrial areas and fluids obtained from WWTP were culture-positive for PSC. Moreover, PSC was detected in 3 out of the 9 seashore samples. Only two of the 15 samples collected in vineyards, corresponding to those without soil enrichment, were culture-positive for PSC.

**Table 1** Distribution of different groups of microorganisms in the area types studied.

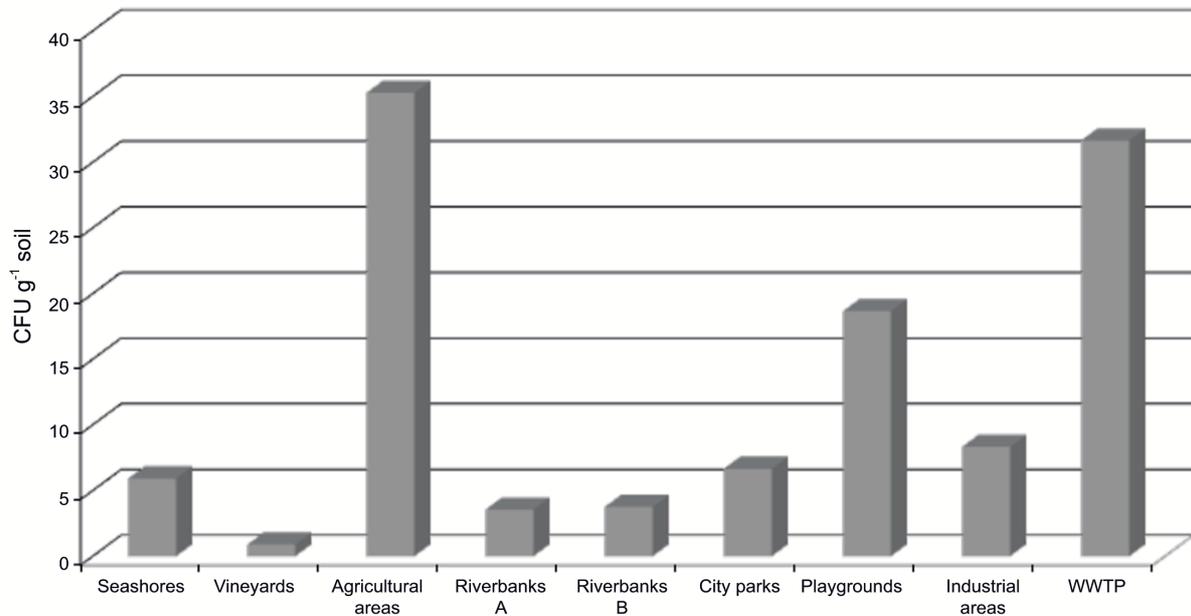
Area type (number of samples)	Number of positive samples for							
	Mucorales	<i>Aspergillus</i>	Other phialide- bearing fungi	PSC*	Other hyaline fungi	Dematiaceous fungi	Yeasts	Single-celled algae
Forest A (10)	10	5	7	-	1	-	-	-
Forest B (10)	10	4	9	-	-	1	-	-
Seashores (9)	6	4	8	3	2	-	3	-
Vineyards (15)	15	12	13	2	5	2	8	-
Agricultural areas (12)	12	7	6	11	10	12	3	-
Riverbanks A (15)	14	10	15	7	3	14	7	-
Riverbanks B (8)	7	7	6	4	4	7	2	-
City parks (10)	10	9	9	4	4	5	1	-
Playgrounds (10)	10	10	10	6	5	6	5	-
Industrial areas (10)	10	8	9	5	4	7	4	-
WWTP** fluids (10)	8	5	9	6	9	2	10	8
Total (119)	112	81	101	48	47	56	43	8

\*PSC: *Pseudallescheria / Scedosporium* complex.

\*\*WWTP: wastewater treatment plant.

Regarding PSC, variations between the area types studied were also seen in cell density (Fig. 1). The highest density of PSC species was found in agricultural areas (35.3 CFU g<sup>-1</sup> soil), followed by fluids obtained from WWTP (31.7 CFU g<sup>-1</sup> soil) and playgrounds (18.7 CFU g<sup>-1</sup> soil). In contrast, the lowest densities of these fungi (from 0.9 to 5.9 CFU g<sup>-1</sup> soil) were encountered in vineyards and areas in contact with water (riverbanks and seashores).

A statistical analysis was conducted to evaluate the association between the areas types and the microorganisms classified in the eight groups presented in table 1. The hierarchical tree obtained by Agglomerative Hierarchical Classification revealed five classes (see Fig. S1) whose characteristics are summarized in Table 2. Class 1 that grouped forests A and B was characterized by the presence of Mucorales and other phialide-bearing fungi and was negatively associated with dematiaceous fungi, yeasts and PSC. Class 2 that gathered seashores and vineyards was negatively associated with dematiaceous fungi. Class 3 including riverbanks A and B, city parks, playgrounds and industrial areas, was defined by the presence of dematiaceous fungi and the absence of single-celled algae. Class 4 corresponding to agricultural areas was defined by PSC and negatively associated with other phialide-bearing fungi. Finally, WWTP was the only area type constituting Class 5 which was associated with the presence of single-celled algae and yeasts.



**Fig. 1** Density of PSC isolates in the area types studied  
WWTP: wastewater treatment plant; CFU: colony forming unit

**Table 2** Characteristics of the different classes of areas revealed by clustering analysis.

Class	Area types	Positive associations			Negative associations		
		Variables	%	<i>p</i>	Variables	%	<i>p</i>
1	Forests A and B	Mucorales	42.55	0.001	Dematiaceous fungi	2.13	0.020
		Other phialide-bearing fungi	34.04	0.15	Yeasts	0.00	0.011
2	Seashores and vineyards	/			Species of PSC*	0.00	0.007
					Dematiaceous fungi	2.41	0.002
3	Riverbanks A and B, city parks, playgrounds and industrial areas	Dematiaceous fungi	15.73	0.001	Single-celled algae	0.00	0.004
4	Agricultural areas	Species of PSC	18.03	0.022	Other phialide-bearing fungi	9.84	0.017
5	WWTP** fluids	Single-celled algae	14.04	< 0.001	/		
		Yeasts	17.54	0.017			

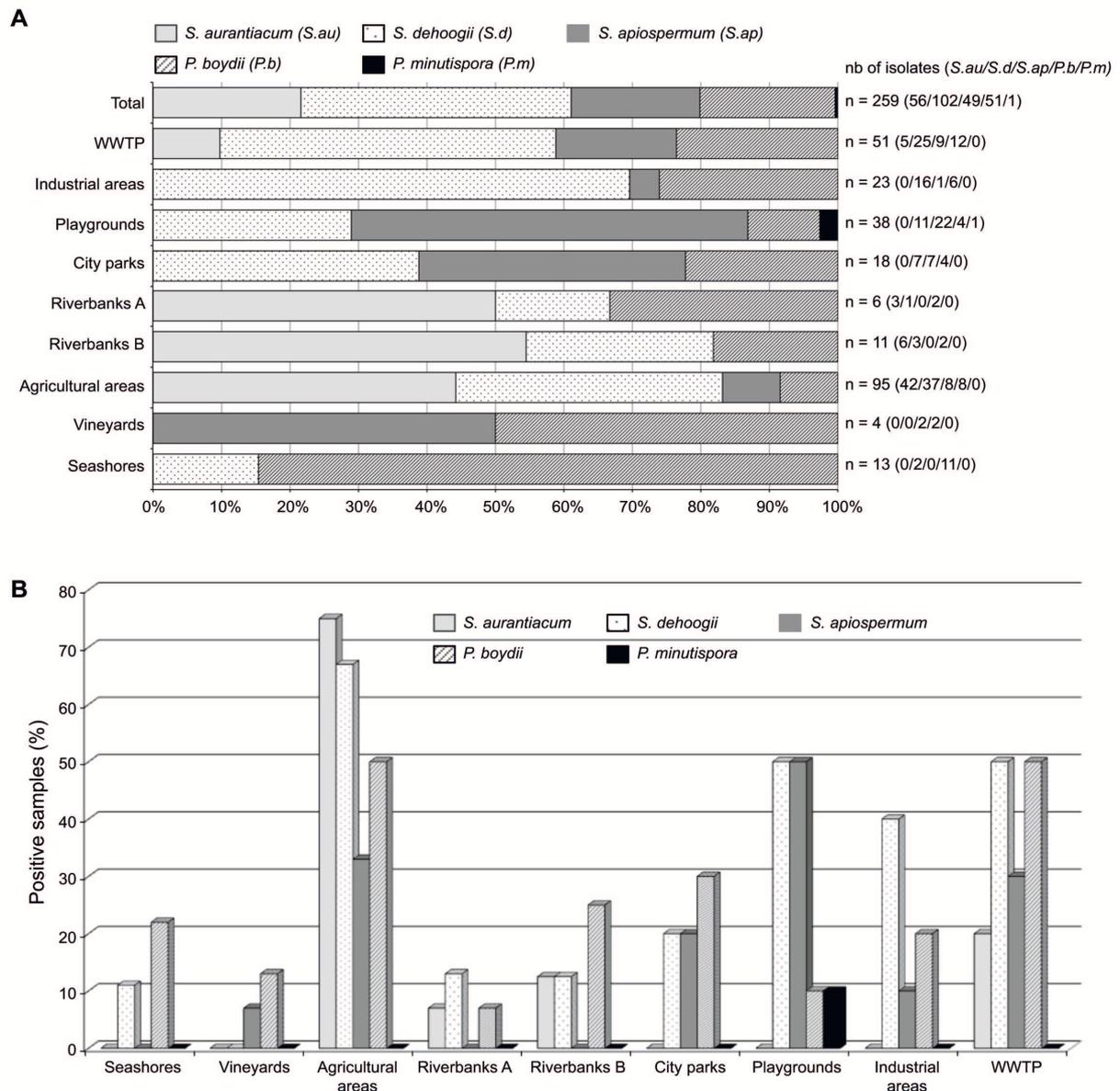
\*PSC: *Pseudallescheria* / *Scedosporium* complex.

\*\*WWTP: wastewater treatment plant.

To evaluate the pH influence on the presence of PSC in soil, pH was measured and the obtained data were divided into 10 classes to construct the histogram presented in figure S2. PSC were isolated from soils with pH comprised between 4.9 and 8.5, but most soil samples that were culture-positive for PSC were in the pH range of 6.1 to 7.9 (see Fig. S2 and Table S1).

Based on morphological features, 368 *Scedosporium* isolates were identified, including only three *Scedosporium prolificans*. Isolation was not always possible due to the simultaneous presence on the primary plates of some extensively growing fungi (*i.e.* Mucorales and aspergilli) and only 259 isolates were available for identification at the species level. Among them, 251 were identified by MALDI-TOF/MS analysis. Species identification was not possible by MALDI-TOF/MS analysis for 8 out of the 259 isolates which were identified by TUB sequencing. To confirm the MALDI-TOF/MS identification, about 25% of the isolates of each PSC species were also sequenced (see Table S2). Thus, a total number of 69 isolates were sequenced, and among them, 8 exhibited only 94-96% similarity with the TUB sequences of *S. dehoogii*. Species identification of these isolates therefore was confirmed by sequencing the ITS1 and 2 regions, part of the calmodulin gene, and a second region (BT2) in the  $\beta$ -tubulin gene (data not shown but available in the GenBank database).

As shown in figure 2A, *S. dehoogii* was the most abundant species isolated in soil samples ( $n = 102$ ) whereas *P. minutispora* was recovered only once from a playground. Similar numbers of *S. aurantiacum* ( $n = 56$ ), *P. boydii* ( $n = 51$ ) and *S. apiospermum* ( $n = 49$ ) isolates were identified. However, the relative distribution of PSC species in the various area types differed. *Scedosporium aurantiacum* was found mainly in the agricultural areas. Indeed, 72% of these soil samples were positive for *S. aurantiacum* (Fig. 2B); this corresponded to 42 of the overall 56 isolates collected (Fig. 2A). This species was also isolated from 20% of WWTP fluid samples and from 7% and 12.5% of banks of the Loire River and of the Mayenne River, respectively (Fig. 2B). *Scedosporium dehoogii* was present in all area types except vineyards (Fig. 2A). It was frequently isolated from agricultural areas (67% of these samples were positive), WWTP fluids and playgrounds (50%) (Fig. 2B). Moreover 40% of samples collected from industrial areas were positive for this species, which represented 70% of PSC isolates recovered from this area type. *Scedosporium apiospermum* accounted for 60% of PSC isolates from playgrounds (Figure 2A). It is also important to note that 50% of playground samples were positive for this species. *Scedosporium apiospermum* was also recovered from agricultural areas (33% of the samples were positive), WWTP fluids (30%) and city parks (20%). In contrast, this species was not found in proximity of water (seashores and riverbanks) (Fig. 2B). *Pseudallescheria boydii* was isolated from all area types and was largely predominant in seashores samples (84% of PSC isolates) (Fig. 2A). Moreover, 50% of agricultural soil samples and WWTP fluids and 30% of city parks samples were positive for this species (Fig. 2B).



**Fig. 2** Distribution of the PSC species in the area types studied: (A) respective frequencies among the identified isolates; (B) respective frequencies in the soil samples studied.

WWTP: wastewater treatment plant

A statistical analysis was performed to evaluate the association between the area types and the various microorganisms identified (26 genera of filamentous fungi, 7 species belonging to the genus *Aspergillus*, the five PSC species, yeasts and single-celled algae). The hierarchical tree obtained by Agglomerative Hierarchical Classification revealed eight classes (see Fig. S2) whose characteristics are summarized in Table 3. The definition of only 3 of the 8 classes took into account a PSC species. Class 2 (vineyards) was defined by the presence of *A. niger* and *Cunninghamella* sp. and negatively associated with the presence of *Trichoderma* sp. and *S. dehoogii*. Class 5 (playgrounds) was characterized by the presence of

*S. apiospermum* and negatively associated with *Cunninghamella* sp. Finally, Class 7 (agricultural areas) was defined by the presence of *S. aurantiacum* and *S. dehoogii* (and other fungi: *Doratomyces* sp. and *Scopulariopsis* sp.).

**Table 3** Features of the different area types studied in term of fungal biota as revealed by clustering analysis.

Class	Area types	Positive associations			Negative associations		
		Variables	%	<i>p</i>	Variables	%	<i>p</i>
1	Forests A and B	<i>Mortierella</i> sp.	19.35	0.001	Yeasts	0.00	0.013
		<i>Absidia</i> sp.	7.53	0.005			
		<i>Penicillium</i> sp.	16.13	0.010			
		<i>Rhizomucor</i> sp.	8.60	0.018			
2	Vineyards	<i>Aspergillus niger</i>	8.26	< 0.001	<i>S. dehoogii</i>	0.00	0.024
		<i>Cunninghamella</i> sp.	8.26	0.007	<i>Trichoderma</i> sp.	0.00	0.024
3	Riverbanks B and city parks	/			<i>Aspergillus niger</i>	0.00	0.018
4	Seashores and industrial areas	<i>Aspergillus versicolor</i>	4.05	< 0.001	/		
5	Playgrounds	<i>S. apiospermum</i>	4.85	0.019	<i>Cunninghamella</i> sp.	0.00	0.020
6	Riverbanks A	<i>Cladosporium</i> sp.	6.47	< 0.001	<i>Scopulariopsis</i> sp.	0.00	0.006
		<i>Alternaria</i> sp.	4.32	0.001			
		<i>Aspergillus terreus</i>	3.60	0.018			
		<i>S. aurantiacum</i>	7.50	< 0.001			
7	Agricultural areas	<i>Doratomyces</i> sp.	10.00	< 0.001	/		
		<i>Scopulariopsis</i> sp.	8.33	0.004			
		<i>S. dehoogii</i>	6.67	0.014			
		Single-celled algae	8.60	< 0.001			
8	WWTP* fluids	<i>Geotrichum</i> sp.	9.68	< 0.001	<i>Mortierella</i> sp.	0.00	< 0.001
		Yeasts	10.75	0.005			

\*WWTP: wastewater treatment plant

## Discussion

In order to understand the increasing incidence of PSC species in human infections, a better knowledge of their habitat is necessary. Previous studies have been performed in Austria and Australia highlighting different distribution patterns (Harun *et al.*, 2010; Kaltseis *et al.*, 2009). Recently, we reported a higher frequency of *P. boydii* colonizing the lungs of CF patients in France (especially in Western France) than in other European countries (Zouhair *et al.*, 2013).

The present study, therefore, was designed to evaluate the influence of geographical settings (human activities, fungal biota and pH) on the presence of PSC species. A culture-based approach was used to obtain a picture of the fungi living in soils. Despite the inability to culture some microorganisms, this is a fast and inexpensive method that provides information on active populations (Kirk *et al.*, 2004). We identified 26 genera of filamentous fungi, including *Mortierella*, *Mucor*, *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium* already known as

common soil fungi (Thorn, 1997), as well as yeasts and single-celled algae. Our results are in agreement with previous reports: *Mortierella* and *Penicillium* species were associated with forest soils (Thorn, 1997) while *A. niger* was correlated with vineyards (Hocking *et al.*, 2007). However on YPDA medium, fast and extensively growing fungi such as *Aspergillus* or Mucorales may overcome growth of PSC. Consequently, more than 97% of PSC colonies were isolated using a semi-selective medium we developed previously (unpublished data). This culture medium, called Scedo-Select III, prevents or limits the development of these fast-growing fungi and well supports growth of all PSC species.

In agreement with previous results (Harun *et al.*, 2010; Kaltseis *et al.*, 2009), the highest densities of PSC isolates were recovered from human-impacted areas: agricultural areas, playgrounds, industrial areas and WWTP fluids. Riverbanks revealed a low fungal density and no PSC colonies were recovered from natural habitats (*i.e.* forests). This is consistent with the previously described ability of these fungi to survive in hydrocarbon-contaminated soils like flare pit or oil-soaked soils (April *et al.*, 1998, 1999) in relation with their capacity to use natural gas (Guarro *et al.*, 2006), to degrade linear aliphatics (April *et al.*, 1998, 1999) and aromatic compounds (Claußen and Schmidt, 1998, 1999). Moreover, the risk for scedosporiosis after aspiration of sewage or highly polluted, stagnant or muddy waters, as in near-drowning incidents, is a well-known phenomenon. Interestingly, 33 to 50% of the samples we collected from soils in contact with water (*i.e.* seashores and riverbanks) were culture-positive for PSC. Results from WWTP fluids raise the question of the risk on human health using sludge for enrichment of agricultural lands.

This environmental investigation also confirmed the influence of pH on PSC occurrence. No PSC isolates were found at acid pH (forests soils) or at a pH value > 8.27, and only a few in basic soils. However, surprising results were observed from vineyards. No PSC colonies were recovered for this area type except from 2 samples corresponding to those without soil enrichment. Soil enrichment is usually associated with an increase in ammonium content, previously reported by Kaltseis and colleagues (2009) as associated with PSC abundance. The absence of PSC in enriched soils suggests that additional factor(s) may affect its development. More intensive fungicidal treatments in vineyards than in agricultural areas may be an explanation. Moreover, exclusion of PSC by the presence of other microorganisms should also be suspected. Influence of *A. niger* and species of *Cunninghamella*, which characterized vineyards, or bacteria present in soil should be investigated.

*Scedosporium dehoogii* was the most frequent species in the environment whereas *P. minutispora* was isolated only once. One may speculate about the risk of underestimating the frequency of *P. minutispora*. Indeed, even if this species is able to grow at 37°C, colonies grow faster and are larger at 25°C. Plates with the semi-selective medium were incubated only at 37°C.

Equal amounts of *S. aurantiacum*, *S. apiospermum* and *P. boydii* isolates were identified (22.2%, 18.8% and 19.5% of all PSC isolates, respectively). These proportions differed in Austria, where *S. apiospermum* was the most common species followed by *S. dehoogii* (Kaltseis *et al.*, 2009), and in Australia, where *S. aurantiacum* accounted for 54.6% of all environmental isolates (Harun *et al.*, 2010). These discrepancies in the distribution patterns of PSC between countries may be related to differences in climate or agricultural practices.

Moreover, ecological preferences of each species were observed. As in Austria (Kaltseis *et al.*, 2009), *S. dehoogii* was more abundant in areas with high human activity. It was the predominant species (70% of all PSC isolates) in industrial areas and was associated with agricultural areas. *Scedosporium aurantiacum* characterized agricultural areas but this association was not reported previously. In Australia, this species was recovered mainly in urban areas (Harun *et al.*, 2010). *Scedosporium apiospermum* was associated with playgrounds. Finally, even if it is predominant in seashores, *P. boydii* was the only species found in all areas (except natural habitats).

Geographical settings of PSC species do not explain alone their respective frequencies in clinical cases, especially in the CF context. Whereas the respective frequencies of *S. apiospermum* and *S. aurantiacum* in CF and in the environment are quite similar, *P. boydii* is overrepresented in this disease, particularly in Western France (Zouhair *et al.*, 2013). Its ubiquitous feature may partly explain its frequency, favoring more regular contacts between the host and this opportunistic pathogen. Moreover, *S. dehoogii* is the most frequent species in the environment and described as the most virulent (Gilgado *et al.*, 2009), but it was never found in the CF context. Thus, complementary studies are needed to evaluate the respective ability of PSC species to establish in lungs of patients with defective respiratory secretions and their respective virulence in CFTR mice for instance.

In summary, species of PSC are ubiquitous in soils in France. Their occurrence is associated with human activity. However, their presence in the environment is not sufficient to explain their incidence in CF. A better knowledge of their virulence mechanisms is required to elucidate the differences in their frequencies in the CF context.

## Acknowledgments

The authors acknowledge Pr Aziz Ballouche and Dr Alain Jadas-Hecart from UMR 6554 CNRS for fruitful discussions.

## Conflict of interest

None to declare.

## References

- Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL (2007) Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates. *Antimicrob Agents Chemother* **51**: 748–751
- April TM, Abbott SP, Foght JM, Currah RS (1998) Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microasaceae). *Can J Microbiol* **44**: 270–278
- April TM, Foght JM, Currah RS (1999) Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can J Microbiol* **46**: 38–49
- Benzécri JP (1992) Correspondence Analysis Handbook. Marcel Dekker Incorporated, New-York
- Bernhardt A, Sedlacek L, Wagner S, Schwarz C, Würstl B, Tintelnot K (2013) Multilocus sequence typing of *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. doi: 10.1016/j.jcf.2013.05.007
- Blyth CC, Harun A, Middleton PG, Sleiman S, Lee O, Sorrell TC, Meyer W, Chen SCA (2010a) Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. *J Clin Microbiol* **48**: 314–316
- Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen SCA (2010b) Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S37–44
- Borghi E, Iatta R, Manca A, Montagna MT, Morace G (2010) Chronic airway colonization by *Scedosporium apiospermum* with a fatal outcome in a patient with cystic fibrosis. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S108–113
- Cimon B, Carrère J, Chazalotte JP, Giniès JL, Six P, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP (1995) Fungal colonization and immune response to fungi in cystic fibrosis. *J Mycol Méd* **5**: 211–216
- Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalotte JP, Chabasse D, Bouchara JP (2000) Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 53–56
- Claußen M, Schmidt S (1998) Biodegradation of phenol and p-cresol by the hyphomycete *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol* **149**: 399–406

- Claußen M, Schmidt S (1999) Biodegradation of phenylbenzoate and some of its derivatives by *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol* **150**: 413–420
- Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, et al (2008) Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev* **21**: 157–197
- Cruse M, Telerant R, Gallagher T, Lee T, Taylor JW (2002) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* **94**: 814–822
- Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, Diouri M, Hallet JN, Bouchara JP (2002) Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **40**: 2108–2114
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J (2005) Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* **43**: 4930–4942
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J (2009) Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med Mycol* **47**: 371–374
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J (2008) Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol* **46**: 766–771
- Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, Carrère J, Degand N, Mely L, Favennec L, Dannaoui E, Bouchara JP, Calenda A (2010) *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **48**: 2381–2386
- Greenacre MJ (1984) Theory and applications of correspondence analysis. Academic Press, London; Orlando, Fla.
- Guarro J, Kantarcioglu AS, Horr  R, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, de Hoog GS (2006) *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol* **44**: 295–327
- Harun A, Gilgado F, Chen SCA, Meyer W (2010) Abundance of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways in cystic fibrosis. *Med Mycol* **48** Suppl 1: S70–76
- Heath CH, Slavin MA, Sorrell TC, Handke R, Harun A, Phillips M, Nguyen Q, Delhaes L, Ellis D, Meyer W, et al (2009) Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin Microbiol Infect* **15**: 689–693
- Hennequin C, Benailly N, Silly C, Sorin M, Scheinmann P, Lenoir G, Gaillard JL, Berche P (1997) In vitro susceptibilities to amphotericin B, itraconazole, and miconazole of filamentous fungi isolated from patients with cystic fibrosis. *Antimicrob Agents Chemother* **41**: 2064–2066

- Hirschi S, Letscher-Bru V, Pottecher J, Lannes B, Jeung MY, Degot T, Santelmo N, Sabou AM, Herbrecht R, Kessler R (2012) Disseminated *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Scedosporium apiospermum* coinfection after lung and liver transplantation in a cystic fibrosis patient. *J Clin Microbiol* **50**: 4168–4170
- Hocking AD, Leong SLL, Kazi BA, Emmett RW, Scott ES (2007) Fungi and mycotoxins in vineyards and grape products. *Int J Food Microbiol* **119**: 84–88
- de Hoog GS, Guarro J, Gené J, Figueras MJ (2000) Atlas of Clinical Fungi, Second Edition. American Society for Microbiology.
- Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Nidermajer S, Reiffert SM (2009) Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients. *Respiration* **77**: 320–324
- Kaltseis J, Rainer J, de Hoog GS (2009) Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol* **47**: 398–405
- Katragkou A, Dotis J, Kotsiou M, Tamiolaki M, Roilides E (2007) *Scedosporium apiospermum* infection after near-drowning. *Mycoses* **50**: 412–421
- Kirk JL, Beaudette LA, Hart M, Moutoglis P, Klironomos JN, Lee H, Trevors JT (2004) Methods of studying soil microbial diversity. *J Microbiol Methods* **58**: 169–188
- Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, Meis JF (2012) Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 2635–2642
- Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W (2013) Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med Mycol*. doi: 10.3109/13693786.2013.792438
- Miraldi F, Anile M, Ruberto F, Tritapepe L, Puglese F, Quattrucci S, Messina T, Vitolo D, Venuta F (2012) *Scedosporium apiospermum* atrial mycetomas after lung transplantation for cystic fibrosis. *Transpl Infect Dis* **14**: 188–191
- Morin O, Haloun A, Treilhaud M, Sagan C, Boiron P (1999) Mycose systémique à *Pseudallescheria boydii* chez une patiente greffée bipulmonaire pour une mucoviscidose : Etude des souches isolées en RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA). *J Mycol Méd* **9**: 119–123
- Morio F, Horeau-Langlard D, Gay-Andrieu F, Talarmin JP, Haloun A, Treilhaud M, Despins P, Jossic F, Nourry L, Danner-Boucher I, et al (2010) Disseminated *Scedosporium* / *Pseudallescheria* infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **48**: 1978–1982
- Panichpisal K, Nugent K, Sarria JC (2006) Central nervous system pseudallescheriasis after near-drowning. *Clin Neurol Neurosurg* **108**: 348–352

- Paugam A, Baixench MT, Demazes-Dufeu N, Burgel PR, Sauter E, Kanaan R, Dusser D, Dupouy-Camet J, Hubert D (2010) Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S32–36
- Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, Denis O, Estenne M, Nolard N, Jacobs F (2006) Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* **25**: 603–607
- Thorn G (1997) The fungi in soil. Modern soil microbiology. JD Van Elsas, JT Trevors, EMH Wellington, pp 63–127
- Vázquez-Tsuji O, Campos Rivera T, Rondán Zárate A, Mirabal García M (2006) Endobronchitis by *Scedosporium apiospermum* in a child with cystic fibrosis. *Rev Iberoam Micol* **23**: 245–248
- Williamson EC, Speers D, Arthur IH, Harnett G, Ryan G, Inglis TJ (2001) Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. *J Clin Microbiol* **39**: 47–50
- Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S (2013) Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* **51**: 603–13

## Supporting information

**Table S1** Presence of PSC according to pH of the soil samples analyzed.

Area type (mean pH values $\pm$ SD)	pH value $\pm$ SD*	Presence of PSC**	
Forest A (4.65 $\pm$ 0.87)	4.82 $\pm$ 0.03	-	
	4.38 $\pm$ 0.03	-	
	4.85 $\pm$ 0.05	-	
	4.58 $\pm$ 0.19	-	
	6.87 $\pm$ 0.06	-	
	3.80 $\pm$ 0.05	-	
	3.75 $\pm$ 0.05	-	
	4.23 $\pm$ 0.03	-	
	4.40 $\pm$ 0.00	-	
	4.83 $\pm$ 0.03	-	
Forest B (4.69 $\pm$ 0.17)	4.40 $\pm$ 0.10	-	
	4.47 $\pm$ 0.06	-	
	4.77 $\pm$ 0.06	-	
	4.57 $\pm$ 0.06	-	
	4.77 $\pm$ 0.06	-	
	4.80 $\pm$ 0.10	-	
	4.73 $\pm$ 0.06	-	
	4.90 $\pm$ 0.00	-	
	4.87 $\pm$ 0.06	-	
	4.60 $\pm$ 0.10	-	
Seashores (8.80 $\pm$ 0.63)	8.23 $\pm$ 0.06	+	
	8.13 $\pm$ 0.12	+	
	8.43 $\pm$ 0.12	-	
	8.20 $\pm$ 0.10	-	
	8.87 $\pm$ 0.12	-	
	9.50 $\pm$ 0.10	-	
	9.53 $\pm$ 0.06	-	
	9.50 $\pm$ 0.10	-	
	Vineyards (7.13 $\pm$ 0.30)	7.60 $\pm$ 0.17	-
		7.37 $\pm$ 0.12	-
6.90 $\pm$ 0.10		-	
6.90 $\pm$ 0.10		-	
7.60 $\pm$ 0.17		-	
7.38 $\pm$ 0.13		-	
6.53 $\pm$ 0.12		-	
6.90 $\pm$ 0.00		+	
7.20 $\pm$ 0.00		-	
7.27 $\pm$ 0.06		-	
6.83 $\pm$ 0.06		-	
7.17 $\pm$ 0.06		+	
7.27 $\pm$ 0.06		-	
7.07 $\pm$ 0.06		-	
7.00 $\pm$ 0.00		-	
Agricultural areas (6.94 $\pm$ 0.59)	6.62 $\pm$ 0.08	+	
	6.53 $\pm$ 0.06	+	
	6.40 $\pm$ 0.00	+	
	7.68 $\pm$ 0.20	+	
	7.02 $\pm$ 0.13	+	
	5.77 $\pm$ 0.03	+	
	7.32 $\pm$ 0.03	+	
	7.77 $\pm$ 0.12	+	
	7.20 $\pm$ 0.10	+	
	7.50 $\pm$ 0.17	+	
	6.73 $\pm$ 0.06	-	
	6.80 $\pm$ 0.10	+	
	Riverbanks A (6.99 $\pm$ 0.96)	4.88 $\pm$ 0.10	+
		6.08 $\pm$ 0.18	-
		8.00 $\pm$ 0.00	-
6.15 $\pm$ 0.00		+	
8.27 $\pm$ 0.12		+	
7.10 $\pm$ 0.26		-	
8.40 $\pm$ 0.20		-	
7.05 $\pm$ 0.23		-	

**Table S1 (Continued)**

	7.17 ± 0.12	+
	7.17 ± 0.08	+
	7.20 ± 0.00	-
	7.57 ± 0.06	-
	6.73 ± 0.06	+
	6.03 ± 0.06	-
Riverbanks B (6.75 ± 0.62)	6.37 ± 0.06	-
	7.07 ± 0.12	+
	5.90 ± 0.10	-
	5.87 ± 0.12	+
	7.43 ± 0.06	-
	7.30 ± 0.00	+
	6.95 ± 0.18	-
	7.13 ± 0.06	+
Cityparks (6.55 ± 0.81)	7.60 ± 0.10	+
	5.80 ± 0.00	-
	6.67 ± 0.06	-
	6.17 ± 0.12	+
	6.57 ± 0.06	-
	7.40 ± 0.26	+
	6.42 ± 0.03	-
	6.20 ± 0.10	-
	5.10 ± 0.00	-
	7.62 ± 0.10	-
Playgrounds (7.13 ± 0.81)	7.20 ± 0.00	-
	7.87 ± 0.23	-
	8.32 ± 0.16	-
	7.40 ± 0.62	-
	8.20 ± 0.20	+
	5.97 ± 0.20	+
	6.77 ± 0.20	+
	6.47 ± 0.06	+
	6.80 ± 0.46	+
	6.33 ± 0.50	+
Industrial areas (7.35 ± 1.17)	5.88 ± 0.14	-
	6.57 ± 0.21	+
	7.37 ± 0.06	+
	8.13 ± 0.12	+
	8.63 ± 0.06	-
	8.00 ± 0.00	-
	5.00 ± 0.10	-
	7.63 ± 0.06	-
	8.27 ± 0.06	-
	8.00 ± 0.00	+

\*Data are mean values of triplicate determinations.

\*\*PSC: *Pseudallescheria* / *Scedosporium* complex.

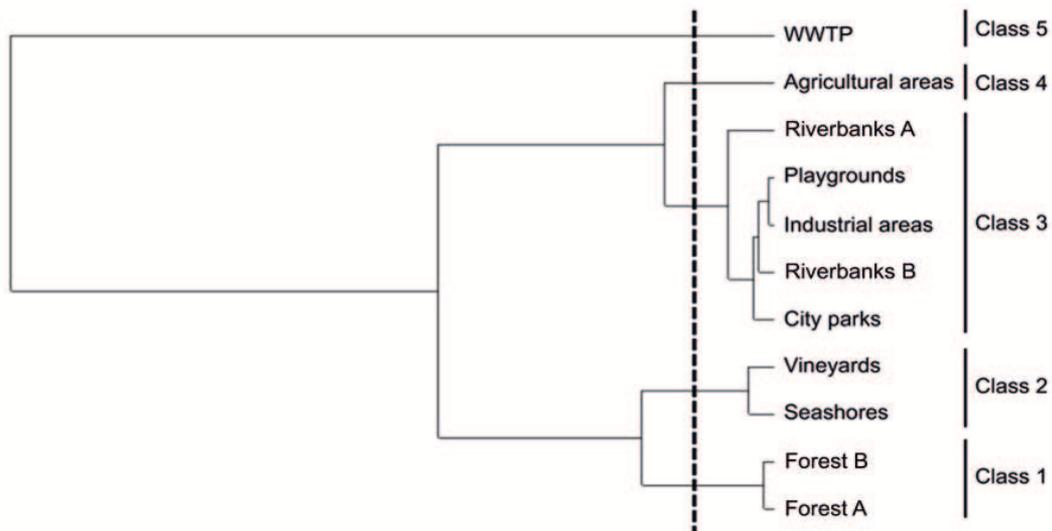
**Table S2** Sampling informations and sequence data of PSC isolates identified by TUB sequencing.

Area type	Sampling date	PSC* isolate number	Genbank accession number	Molecular identification
Seashores	25/12/2011	UA120008835-01**	KC779504	<i>P. ellipsoidea</i>
		UA120008836-01/2	KC779505	<i>P. ellipsoidea</i>
Agricultural areas	29/11/2011	UA110350871-01/2	KC779472	<i>S. aurantiacum</i>
		UA110350907-01/5	KC779473	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354504-01/1	KC779474	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354504-01/2	KC779475	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354504-01/3	KC779476	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354509-01/3	KC779477	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354513-01/3	KC779478	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354516-01/2	KC779479	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354521-01/2	KC779480	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354521-01/3	KC779481	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354529-01/2	KC779482	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354532-01/1	KC779483	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354537-01/2	KC779484	<i>P. ellipsoidea</i>
		UA110354559-01/1	KC779485	<i>S. dehoogii</i>
		UA110354561-01/4	KC779486	<i>P. ellipsoidea</i>
Riverbanks A	20/10/2011	UA110349103-01/3	KC779439	<i>S. aurantiacum</i>
		UA110349211-01/1	KC779440	<i>S. aurantiacum</i>
		UA110349211-01/2	KC779441	<i>S. aurantiacum</i>
		UA110349211-01/3	KC779442	<i>S. aurantiacum</i>
		UA110349218-01/1	KC779443	<i>P. ellipsoidea</i>
		UA110349218-01/2	KC779444	<i>P. ellipsoidea</i>
		UA110349226-01/1	KC779445	<i>S. dehoogii</i>
		UA110349226-01/2	KC779446	<i>S. dehoogii</i>
	20/03/2012	UA120131459-01	KC779509	<i>S. dehoogii</i>
Riverbanks B	18/11/2011	UA110350851-01	KC779470	<i>P. boydii</i>
Cityparks	04/11/2011	UA110350137-01	KC779447	<i>P. boydii</i>
		UA110349252-01/2	KC779448	<i>P. ellipsoidea</i>
		UA110349255-01/2	KC779449	<i>S. dehoogii</i>
		UA110349255-01/3	KC779450	<i>S. dehoogii</i>
Playgrounds	10/11/2011	UA110350824-01/1	KC779451	<i>S. apiospermum</i>
		UA110350824-01/2	KC779452	<i>S. apiospermum</i>
		UA110350824-01/3	KC779453	<i>P. minutispora</i>
		UA110350824-01/4	KC779454	<i>S. dehoogii</i>
		UA110350144-01/2	KC779455	<i>S. dehoogii</i>
		UA110350144-01/3	KC779456	<i>S. dehoogii</i>
		UA110349294-01/1	KC779457	<i>S. dehoogii</i>
		UA110349301-01/2	KC779458	<i>P. boydii</i>
		UA110349301-01/3	KC779459	<i>S. apiospermum</i>
		UA110349301-01/7	KC779460	<i>S. apiospermum</i>
		UA110349301-01/8	KC779461	<i>P. boydii</i>
		UA110349301-01/9	KC779462	<i>S. apiospermum</i>
		UA110349301-01/10	KC779463	<i>S. apiospermum</i>
		UA110349310-01	KC779464	<i>S. dehoogii</i>
		UA110349316-01	KC779465	<i>S. apiospermum</i>
		UA110349321-01/1	KC779466	<i>S. apiospermum</i>
		UA110349322-01	KC779467	<i>S. dehoogii</i>
		UA110349325-01/1	KC779468	<i>S. apiospermum</i>
		UA110350146-01	KC779469	<i>S. dehoogii</i>
Industrial areas	18/11/2011	UA110350863-01	KC779471	<i>S. dehoogii</i>
	25/12/2011	UA120008843-01/1	KC779506	<i>P. boydii</i>
		UA120008844-01/1	KC779507	<i>P. boydii</i>
		UA120008846-01/1	KC779508	<i>P. boydii</i>
WWTP*** fluids	15/12/2011	UA120008797-01/2	KC779487	<i>S. dehoogii</i>
		UA120008799-01/4	KC779488	<i>S. dehoogii</i>
		UA120008799-01/5	KC779489	<i>S. dehoogii</i>
		UA120008800-01/4	KC779490	<i>P. boydii</i>
		UA120008801-01/1	KC779491	<i>S. dehoogii</i>
		UA120008801-01/2	KC779492	<i>S. dehoogii</i>
		UA120008801-01/4	KC779493	<i>P. boydii</i>
		UA120008807-01/1	KC779494	<i>S. apiospermum</i>
		UA120008808-01/1	KC779495	<i>P. boydii</i>
		UA120008815-01/2	KC779498	<i>S. dehoogii</i>
		UA120008815-01/3	KC779499	<i>P. boydii</i>
		UA120008815-01/4	KC779500	<i>P. boydii</i>
		UA120008819-01/3	KC779501	<i>S. apiospermum</i>
		UA120008824-01/2	KC779502	<i>S. aurantiacum</i>
		UA120008825-01/1	KC779503	<i>S. apiospermum</i>

\*PSC: *Pseudallescheria / Scedosporium* complex.

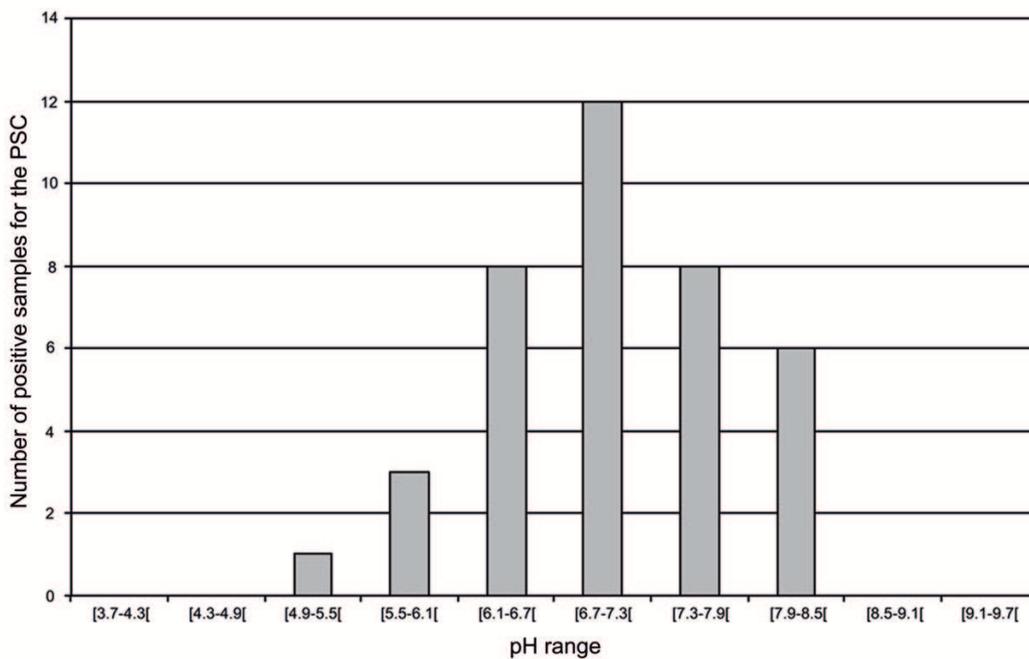
\*\*UA: University of Angers.

\*\*\*WWTP: wastewater treatment plant.



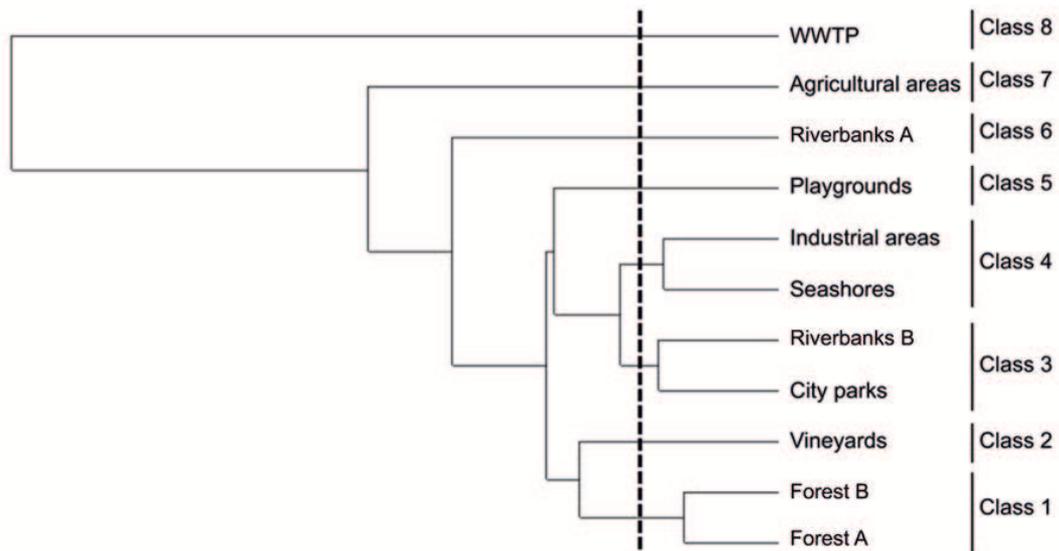
**Fig. S1** Hierarchical tree of the area types studied revealed by Agglomerative Hierarchical Classification according to the 8 groups of microorganisms living in soils.

Analysis was performed according to the 8 groups of microorganisms (Mucorales, *Aspergillus* species, other phialide-bearing fungi, *P. boydii* / *S. apiospermum* species complex, other hyaline filamentous fungi, dematiaceous fungi, yeasts, single-celled algae) living in soils. The dashed line marks the level the truncation was carried out. Five classes were observed after truncation.



**Fig. S2** Influence of soil pH on the presence of PSC.

Mean pH values were divided into 10 classes; the amplitude of each class was determined by dividing the amplitude of the mean pH values by the number of classes.



**Fig. S3** Hierarchical tree of the area types studied revealed by Agglomerative Hierarchical Classification according to all different genera or species living in soils.

Analysis was performed according to all different genera or species (*i.e.* 26 genera of filamentous fungi, 7 species belonging to the genus *Aspergillus*, the 5 PSC species, yeasts and single-celled algae) The dashed line marks the level the truncation was carried out. Eight classes were observed after truncation.

### Introduction de l'étude 3

Au cours de l'étude précédente, des méthodes culturales ont été utilisées pour analyser la distribution environnementale des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. Ces méthodes peu coûteuses nous ont permis d'identifier la flore microbienne présente dans les échantillons de sol. Toutefois, il serait intéressant de disposer d'un outil plus rapide, plus sensible et plus spécifique. Nous nous sommes donc proposés de développer une méthode de détection spécifique du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* basée sur l'amplification par PCR quantitative de l'ADN génomique des espèces de ce complexe et d'utiliser cet outil à partir d'échantillons de sol.

L'alignement de 59 séquences du fragment CAL du gène de la calmoduline des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* a permis l'obtention d'une séquence consensus partageant *in silico* 78% à 80% d'homologie avec d'autres espèces de champignons filamenteux (*Colletotrichum* sp. et *Fusarium* sp. notamment). La région cible de notre technique d'amplification a donc été choisie pour son identité maximale entre les espèces du complexe et minimale avec les autres champignons filamenteux. La PCR quantitative ainsi développée s'est avérée spécifique, même si un plus faible signal a été obtenu pour *P. minutispora*. Cette technique présentait un seuil de sensibilité de 100 fg d'ADN extrait de culture pure (soit moins de 10 génomes) et une efficacité de 94%.

La performance de cet outil démontrée à partir d'ADN extraits de culture pure a ensuite été évaluée pour la détection du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* dans des ADN extraits d'échantillons de sol. Or, l'extraction d'ADN du sol étant une étape cruciale conditionnant la détection à suivre, nous avons choisi de l'optimiser en travaillant sur du terreau, préalablement stérilisé, artificiellement contaminé par des spores de *Pseudallescheria* / *Scedosporium*.

Dans un premier temps, la capacité à extraire l'ADN des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* du sol de quatre kits commerciaux a été comparée et évaluée grâce à deux amplifications par PCR ciblant les régions ITS des ADN ribosomiaux, l'une panfongique et l'autre spécifique des genres *Pseudallescheria* / *Scedosporium*. Une amplification a été obtenue avec la PCR panfongique pour tous les extraits du kit PowerSoil® réalisés à partir des terreaux (artificiellement contaminés par *Pseudallescheria* / *Scedosporium* ou non) et pour cinq extraits du kit E.Z.N.A.® de terreaux artificiellement contaminés. La PCR spécifique

de *Pseudallescheria / Scedosporium* a permis l'obtention d'une amplification pour quatre extraits de terreaux artificiellement contaminés (par  $5.10^6$ ,  $5.10^5$ ,  $5.10^4$  et  $5.10^3$  spores) par les deux kits. Le kit PowerSoil®, révélé plus efficace que le kit E.Z.N.A.® dans l'extraction d'ADN de champignons filamenteux, a été sélectionné pour les tests suivants.

Dans un second temps, notre technique de PCR quantitative a été utilisée sur les extraits d'ADN obtenus avec le kit PowerSoil® pour les terreaux artificiellement contaminés. Cette méthode de détection s'est avérée sensible (limite de détection : 50 spores) et efficace (98%). Nous avons par ailleurs amélioré la sensibilité (5 spores) en utilisant une pré-amplification (nested-PCR), mais avec une perte d'efficacité (75%).

Malheureusement, nous n'avons pas obtenu de signal lors de l'utilisation de cette méthode sur des échantillons de terre positifs en culture pour le complexe *S. apiospermum / P. boydii*.

## ETUDE 3 : Détection et quantification du complexe d'espèces *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* dans des échantillons de sol par PCR quantitative

### Manuscrit en préparation

Les espèces du complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* sont des champignons pathogènes émergents capable de survivre dans des environnements impactés par les activités humaines de part leur capacité à dégrader les composés aromatiques et les gaz naturels. La détection de ces espèces dans l'environnement, particulièrement, dans le sol, s'appuie généralement sur des méthodes cultures utilisant des milieux de cultures semi-sélectifs. Cette étude a été menée dans le but de développer une méthode de détection moléculaire quantitative et efficace des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* dans l'environnement. Nous avons développé une technique de PCR temps réel spécifique des espèces de ce complexe, sensible (100 fg of DNA) et efficace (94%). Le kit PowerSoil® DNA isolation s'est avéré plus efficace que les trois autres kits commerciaux d'extraction d'ADN (*i.e.* le kit E.Z.N.A.® soil DNA, le kit FastDNA SPIN® et le kit NucliSENS EasyQ® basic) comparés dans cette étude. Lorsque notre technique de PCR temps réel a été utilisée en association avec le kit PowerSoil® DNA isolation sur des prélèvements de sol contaminés artificiellement, la méthode de détection était sensible (50 spores) et efficace (98%). Malheureusement, aucun signal n'a été obtenu avec notre technique de PCR temps réel appliquée à des extraits d'ADN réalisés avec le kit PowerSoil® DNA isolation sur des échantillons de sol positifs en culture pour les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. Comme ce résultat décevant pourrait être expliqué par la faible densité de ces espèces dans les échantillons de sol par rapport à celle d'autres champignons filamenteux, des expériences supplémentaires sont nécessaires pour développer une étape initiale de concentration des éléments fongiques.

## Real-time PCR assay for detection and quantification of the *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* species complex in soil samples

Species of the *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* complex (PSC) are emerging fungal pathogens able to survive in human-impacted environments because of its capacity to degrade aromatic compounds and natural gas. Detection of PSC in the environment, especially in soil samples, usually relies on culture-based methods using semi-selective media. The present study was conducted in order to develop an efficient quantitative DNA-based detection method for PSC species in the environment. We developed a real-time PCR assay that was specific of PSC species, sensitive (100 fg of DNAg) and efficient (94%). The PowerSoil® DNA isolation kit revealed to be more efficient than the three other commercial DNA extraction kits (*i.e.* the E.Z.N.A.® soil DNA kit, the FastDNA SPIN® kit and the NucliSENS EasyQ® basic kit) we compared in this study. When our real-time PCR assay was used in combination with the PowerSoil® DNA isolation kit on artificially contaminated soil samples, the detection method was found sensitive (50 PSC spores) and efficient (98%). Unfortunately, no signal was obtained with our real-time PCR assay applied on DNA extracts obtained with the PowerSoil® DNA isolation kit on PSC culture-positive soil samples. As this disappointing result could be explained by the low density of PSC in soil samples contrasting with that of other filamentous fungi, further experiments are needed to develop a initial concentration step of fungal elements.

## Introduction

*Scedosporium apiospermum*, initially considered the anamorph of *Pseudallescheria boydii*, is a filamentous fungus usually living in soil as a saprophyte. This fungus is known to cause human white-grain subcutaneous mycetoma and infections of the central nervous system in immunocompetent individuals after traumatic inoculation of some fungal elements or near-drowning incidents. However, it is mainly described as the causative agent of (i) infections in immunocompromised patients and (ii) colonization of the airways in patients with an anatomically altered respiratory tract like patients with cystic fibrosis or cavities resulting of tuberculosis or sarcoidosis (Cortez *et al.*, 2008).

This ubiquitous fungus is able to survive in poorly ventilated environments or environments with a high osmotic pressure such as polluted soils and water or sewage because of its tolerance to heat, high salt concentrations (5%) and low oxygen pressure and of its capacity to degrade aromatic compounds and natural gas (Cortez *et al.*, 2008). In the past twenty years, *S. apiospermum* has been found in potted plants (Summerbell *et al.*, 1989), manure of livestock (de Hoog *et al.*, 1994), compost (Anastasi *et al.*, 2005), industrial, urban and agricultural areas (Kaltseis *et al.*, 2009). The abundance of this fungus could be related to increasing nitrogen concentrations and decreasing pH suggesting that its frequency in the environment is associated with human activities (Kaltseis *et al.*, 2009).

Recently, molecular data combined with physiological and biochemical studies demonstrated that *S. apiospermum* and *P. boydii* are two distinct species, and permitted the identification of three additional species. Therefore, *S. apiospermum* is now considered a species complex comprising at least five species: *Scedosporium aurantiacum*, *Pseudallescheria minutispora*, *Scedosporium dehoogii*, *S. apiospermum sensu stricto* and *P. boydii* (Gilgado *et al.*, 2005, 2008). Detection of the *S. apiospermum* / *P. boydii* species complex (PSC) in the environment usually relies on culture-based methods using semi-selective media. Rainer and colleagues (2008) designed a *Scedosporium*-selective media, SceSel+, consisting of a modified Leonian's agar supplemented with benomyl, dichloran and antibiotics (Rainer *et al.*, 2008). Recently, a more easy-to-prepare semi-selective media, Scedo-Select III, comprising 4-hydroxybenzoate as carbon source and ammonium sulfate as nitrogen source was proposed (Pham *et al.*, 2010).

Several molecular methods allowing the detection and identification of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species from clinical samples have been previously reported. An oligonucleotide array targeting the internal transcribed spacer (ITS) regions of the ribosomal

DNA (rDNA) gene was developed for direct detection of fungi in the sputum of CF patients, including *P. boydii* / *S. apiospermum* complex and *S. prolificans* (Bouchara *et al.*, 2009). A pan-fungal PCR targeting also the ITS regions of the rDNA gene followed by DNA sequencing was developed to detect multiple fungal genera, including *Scedosporium prolificans* from blood culture specimens (Lau *et al.*, 2008). A rolling-circle amplification has been designed to identify *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species from isolated colonies (Zhou *et al.*, 2008). Recently, Harun and colleagues (2011) designed a multiplex PCR method using species-specific primers for the most common clinical *Scedosporium* species (*S. prolificans*, *S. aurantiacum* and *P. boydii* / *S. apiospermum*) (Harun *et al.*, 2011). However, most of these assays detect only few *Scedosporium* species or require additional step or specialized equipment. Further, they were designed for clinical applications.

A powerful DNA-based detection method of micro-organisms from soil samples requires an efficient extraction step of DNA (Kuske *et al.*, 1998). Indeed, the DNA extraction from soil is influenced by (i) rigidity of the fungal cell wall, and (ii) co-extraction of humic substances that may inhibit PCR reaction (Tsai and Olson, 1991). In the present study, we attempted to develop an efficient quantitative DNA-based detection method for PSC species. Two primers (CALR1 and CALF1) and a TaqMan probe (CAL) were designed to target the calmodulin gene. Specificity and sensibility were analyzed. Validation of the real-time PCR assay was also conducted on soil samples after evaluation of the best DNA extraction method.

## Experimental Procedures

### *Real-time PCR assay development*

(1) Primers and probe design. 59 partial calmodulin (CAL) sequences of species of PSC publically available in the GenBank database were aligned to obtain a consensus sequence using Geneious version 6.1, a bioinformatics software available from <http://www.geneious.com/> (Biomatters, Auckland, New Zealand). Target regions to develop the real-time PCR assay were identified by *in silico* analysis using nucleotide BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Finally, primers and probe were designed using Primer3. The expected size of the DNA fragment amplified was 69 bp.

(2) Real-time PCR assay. The real-time PCR mixture (25 µl) used in our hydrolysis probe-based PCR assay contained 1X IQ supermix (Bio-Rad), 0.4 mM CALR1, 0.1 mM CALF1, 0.5 mM CALprobe and 5 µl of DNA template. Real-time PCR reactions were performed with the Chromo4 Real-Time Detector (Bio-Rad) programmed for an initial denaturation step at 95°C

for 3 min followed by 35 cycles of 15 s at 95°C and 30 s at 60°C. The intensity of fluorescence was monitored at the end of each extension step. Opticon Monitor software automatically constructed the linear standard curve.

**(3) Specificity of the real-time PCR assay.** Six strains belonging to the *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* species complex and 15 other fungal species common in soil were used to develop the real-time PCR assay (Table 1). Isolates were obtained from the collections of (i) the Institute for Hygiene and Microbiology, Brussels, Belgium (IHEM), (ii) the CBS-KNAW Fungal Biodiversity Centre, Utrecht, The Netherlands (CBS), and (iii) the Pasteur Institute, Paris, France (CIP). Four isolates were only conserved in our laboratory. All isolates were preserved by freeze-drying.

For this study, freeze-dried isolates were reconstituted in 1 ml of ultrapure water and inoculated on yeast extract-peptone-dextrose agar (containing in g/l: yeast extract: 5; peptone: 10; dextrose: 20; and agar: 20) supplemented with chloramphenicol 0.5 g/l (YPDA). Morphology was studied both macroscopically and microscopically after mounting in lactic blue stain. DNA extraction from pure cultures was performed as previously described (Giraud *et al.*, 2010).

**(4) Sensitivity of the real-time PCR assay.** Different dilutions of *P. boydii* genomic DNA were used to assess the sensitivity of the real-time PCR assay. Dilutions ranged between 1 ng to 1 fg DNA/ $\mu$ l.

**Table 1.** Fungal strains used in this study.

Strain	IHEM number	Origin	Country of isolation	Isolation date
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	UA110350871-01/2 <sup>a</sup>	E	France	2011/11/29
<i>Pseudallescheria minutispora</i>	21148	E	Spain	1991
<i>Scedosporium dehoogii</i>	UA120008799-01/4 <sup>a</sup>	E	France	2011/12/15
<i>Scedosporium apiospermum</i>	21359	-	-	-
<i>Pseudallescheria boydii</i>	UA110349301-01/8 <sup>a</sup>	E	France	2011/11/10
<i>Pseudallescheria ellipsoidea</i>	UA110354537-01/2 <sup>a</sup>	E	France	2011/11/29
<i>Scedosporium prolificans</i>	21157	C	France	2004/11/29
<i>Cunninghamella bertholletiae</i>	6390	C	United States	1984
<i>Syncephalastrum racemosum</i>	24416	-	-	-
<i>Alternaria alternata</i>	18586	E	Belgium	2001
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	18883	E	Belgium	2001
<i>Beauveria</i> sp.	24418	C	France	2005/06/28
<i>Chrysosporium keratinophilum</i>	24417	-	-	-
<i>Fusarium solani</i>	22464	C	Belgium	1994
<i>Penicillium aurantiogriseum</i>	6611	E	Denmark	1979
<i>Penicillium chrysogenum</i>	20859	E	Belgium	2004
<i>Trichoderma harzianum</i>	CIP 881744 <sup>b</sup>	-	-	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	CBS 113-26 <sup>c</sup>	E	Germany	1926
<i>Aspergillus flavus</i>	6741	-	-	-
<i>Aspergillus terreus</i>	17704	C	France	2000/11/07
<i>Aspergillus niger</i>	17033	-	-	-

<sup>a</sup>Isolates preserved only in our laboratory; <sup>b</sup>CIP number (Institut Pasteur, Paris, France); <sup>c</sup>CBS number (Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, The Netherlands); E, environmental; C, clinical.

### *Real-time PCR assay evaluation*

(1) Spiking soil samples. Mycelium was harvested from 7-day-old cultures in YPD broth, and suspended in 10 ml of sterilized water. The suspension was homogenized with a Potter-Elvehjem system. Eight 10-fold serial suspensions were prepared. Aliquots of 10 µl were streaked in triplicate onto YPDA plates to determine the fungal density. Five grams of sterilized loam aliquots were vigorously mixed with 5 ml of each suspension. The resulting mixtures were filtered through a 100-µm nylon mesh and the obtained filtrates were centrifuged at 4500 rpm for 5 min. Pellets were resuspended into 5 ml of sterile distilled water. Aliquots of 100 µl were streaked onto three YPDA plates to determine the CFU number. Plates were incubated at 37°C for five days. The remaining suspensions were freeze-dried. Pellets were subjected to DNA extraction protocols.

(2) DNA extraction from spiking soil samples. Four commercially available DNA extraction kits were compared on the basis of their ability to isolate DNA from the *P. boydii* / *S. apiospermum* species complex in soil samples: (i) the PowerSoil® DNA isolation kit (MoBio laboratories Inc., Carlsbad, CA, USA); (ii) the E.Z.N.A.® soil DNA kit (Omega Bio-Tek Inc., Norcross, GA, USA); (iii) the FastDNA SPIN® kit for soil (MP Biomedicals LLC, Solon, OH, USA); and (iv) the NucliSENS EasyQ® basic kit (BioMerieux France, Craaponne, France). All kits were used according to the manufacturer's recommendations. DNA concentration was determined using a Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop technologies Inc, Wilmington, DE, USA) at 260 nm. DNA extracts were stored at -20°C until used.

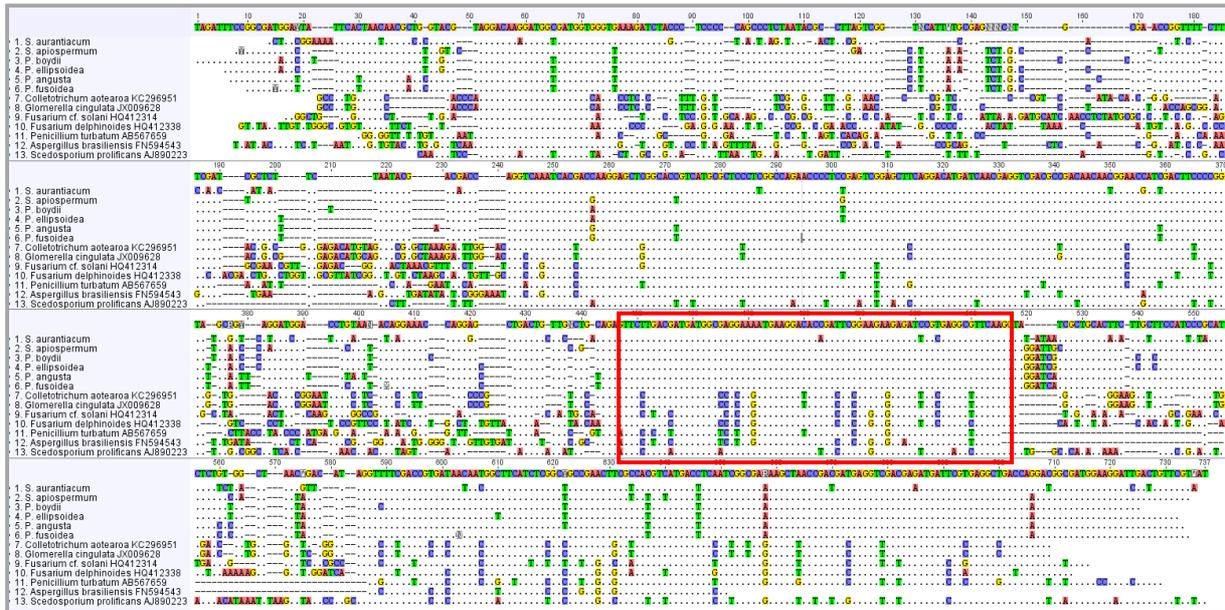
(3) Conventional PCR. PCR were performed by using three primer pairs (ITS4/ITS5; NS7/Scedo1; CL1/CL2a) according to previously described protocols (Gilgado *et al.*, 2005; Wedde *et al.*, 1998). The PCR mixture (25 µl) contained 5 µl of PCR 5X buffer (Promega, Madison, WI), 3 mM MgCl<sub>2</sub> (Promega), 0.2 µM each deoxynucleotide triphosphate (Eurogentec France SASU, Angers, France), 0.2 µM each primer, 1 U of *Taq* DNA Polymerase (Promega) and 5 µl of DNA template. PCR reactions were performed in a Gene-Pro thermal cycler (Bioer Technology Corporation, Hangzhou, China) programmed as follows: initial denaturation at 95°C for 2 min; 35 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s, and 72°C for 30 s; and final extension at 72°C for 5 min. Final products were subjected to 2% agarose gel electrophoresis stained with ethidium bromide and photographed with a Molecular Imager ChemiDoc XRS System (Bio-Rad Laboratories, Marnes-la-Coquette, France). For nested-PCR with CL1/CL2a, the same amplification program was used except that 15 cycles were performed.

## Results and Discussion

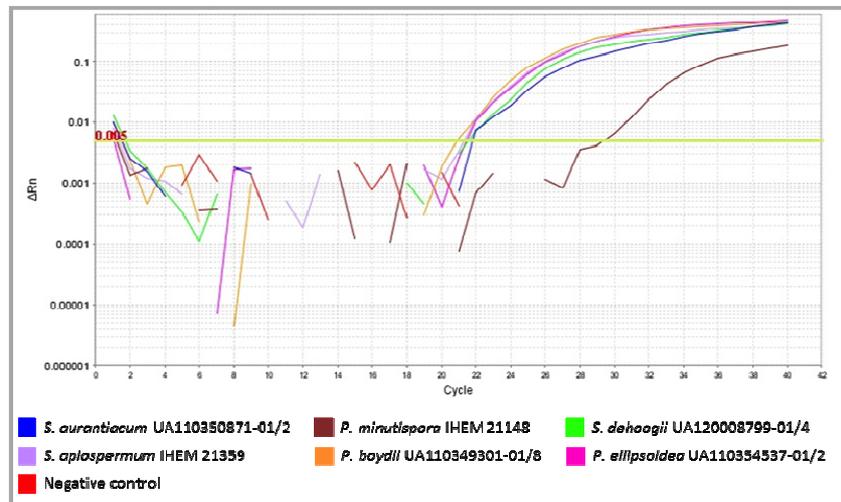
### *Specificity of the real time PCR assay*

Partial calmodulin (CAL) sequences of four strains of *Scedosporium aurantiacum*, two of *Pseudallescheria minutispora*, five of *Scedosporium dehoogii*, twenty-two of *Scedosporium apiospermum* and twenty-six of *Pseudallescheria boydii sensu lato* were aligned using Geneious software. The resulting consensus sequence shared 78 to 80% identity with sequences of strains of *Colletotrichum* sp., *Glomerella cingulata*, *Fusarium solani*, *Fusarium delphinoides*, *Penicillium turbatum* and *Aspergillus brasiliensis*. A target region (Fig. 1) was chosen based on two characteristics: (i) the maximum identity between PSC species, and (ii) the minimum identity with other fungi. Primer set CALF1 (forward) (5'-TTC TTG ACG ATG ATG GCG A-3') and CALR1 (reverse) (5'-CTT GAA CGC CTC (AG)CG (AG)AT-3') and the TaqMan probe CAL (5'-/56-FAM/GGA AAA TGA/ZEN/AGG ACA C(AC)G ATT CGG A/3IABkFQ/-3') were designed using Primer3. Amplification reactions were performed at optimized concentrations of primers and probe (0.4  $\mu$ M CALR1, 0.1  $\mu$ M CALF1 and 0.5  $\mu$ M TaqMan probe CAL). PCR products of 69 bp were thus generated.

The real-time PCR assay specifically detected the PSC. Mean  $C_T$  values for 1 ng of DNA were 21.80, 21.59, 21.16, 20.97 and 21.25 for *S. aurantiacum*, *S. dehoogii*, *S. apiospermum*, *P. boydii* and *P. ellipsoidea*, respectively (Fig. 2). Detection at a mean  $C_T$  value of 29.55 was obtained for *P. minutispora*. No positive signal was detected for 1 ng of DNA of the other fungal species tested listed in Table 1.



**Figure 1.** Aligned sequences of strains belonging to the PSC and strains of *C. aotearoa*, *G. cingulata*, *F. solani*, *F. delphinoides*, *P. turbatum* and *A. brasiliensis*. The DNA region with higher identity between PSC species and low identity with the other fungal species is shown in the red box.



**Figure 2.** Amplification plot obtained for 1 ng of DNA of *S. aurantiacum*, *P. minutispora*, *S. dehoogii*, *S. apiospermum*, *P. boydii* and *P. ellipsoidea*.

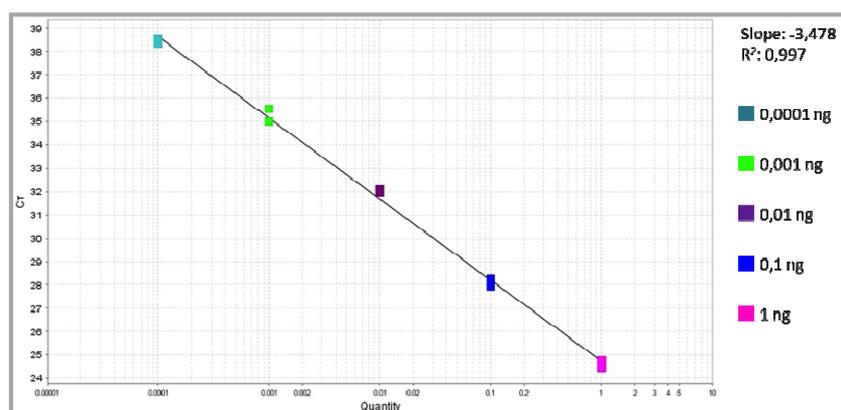
Only two sequences of the fragment CAL of the nuclear gene calmodulin of *P. minutispora* were used for sequence alignment. The weak amplification obtained for strains of this species in our assay could be explained by differences in CAL sequence between strains. As three isolates were recently identified in the context of cystic fibrosis by sequencing four loci

of the fungal genome including the CAL locus (Zouhair *et al.*, 2013), we may obtain enough data to improve the detection of this species. However, the impact of the weak detection of *P. minutispora* in our assay is limited due to the very low frequency of this species. Up to now, *P. minutispora* was considered an environmental species (Gilgado *et al.*, 2009), but environmental studies conducted in Austria and Australia did not find this species (Harun *et al.*, 2010; Kaltseis *et al.*, 2009) and only one isolate was recovered in the environmental study we recently performed in Western France.

#### *Efficiency of the real-time PCR assay*

Mean CT values were 24.62 ( $\pm 0.22$ ), 28.12 ( $\pm 0.24$ ), 32.02 ( $\pm 0.11$ ), 35.26 ( $\pm 0.39$ ), and 38.44 ( $\pm 0.14$ ) for 1 ng, 0.1 ng, 0.01 ng, 1 pg, and 0.1 pg of *P. boydii* DNA. Thus, the sensitivity of the real-time PCR assay was 100 fg of genomic DNA. The coefficient ( $R^2$ ) of the linear regression was 0.997. Amplification efficiency ( $10^{-1/\text{slope}}$ ) was 94 % (Fig. 3). As genomes of PSC species have a size of about 50 Mb and calmodulin is encoded by a single-copy gene in most microorganisms (Davis *et al.*, 1986; Rasmussen *et al.*, 1990), the detection limit of this assay seems to be lower than 10 genomes.

The sensitivity of our assay was 10-fold lower that of a previously described quantitative PCR assay developed for diagnosis of scedosporiosis (Castelli *et al.*, 2008). However, this method based on the amplification of the ITS regions of rDNA gene failed to detect all species within the PSC.



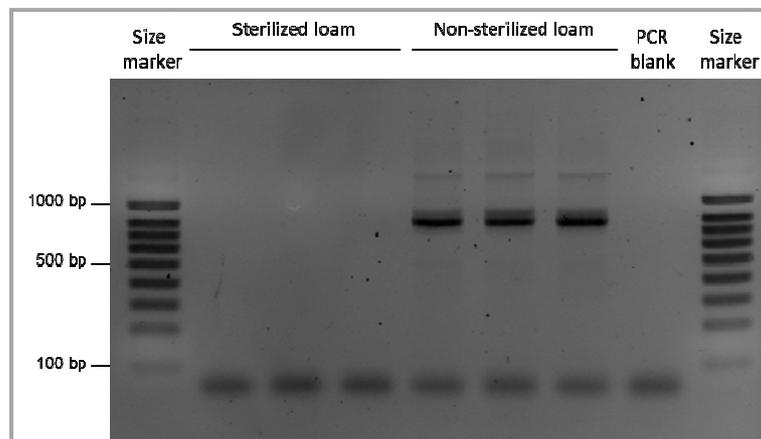
**Figure 3.** Standard curve obtained for dilutions of DNA from pure culture of *P. boydii* UA110349301-01/8.

The real-time PCR assay we developed was specific of PSC species, sensitive (100 fg of DNA) and efficient (94%). In order to validate this assay, we used it to quantify the presence of PSC in environmental samples, particularly in soil samples. As DNA extraction from soil samples is difficult, we tested our assay with artificially contaminated soil samples to optimize conditions of this step.

#### *DNA extraction from artificially contaminated soil samples*

The ability to recover DNA of PSC species from soil of four commercial DNA extraction kits (PowerSoil® DNA isolation kit, E.Z.N.A.® soil DNA kit, FastDNA SPIN® kit for soil, NucliSENS EasyQ® basic kit) was evaluated by PCR. The primer sets ITS4/ITS5 and NS7/Scedo1, both targeting the ITS regions of all rDNA genes, were used to demonstrate that fungal DNA and DNA of PSC species, respectively, were extracted.

In contrast with non-sterilized loam, no amplification was obtained with DNA extracts of autoclaved loam samples using a NS7/Scedo1 PCR (Fig. 4). Thus, sterilized loam was artificially contaminated with different amounts of PSC spores ( $5 \cdot 10^6$ ,  $5 \cdot 10^5$ ,  $5 \cdot 10^4$ ,  $5 \cdot 10^3$ , 500, 50, 5 and 0.5 PSC spores).



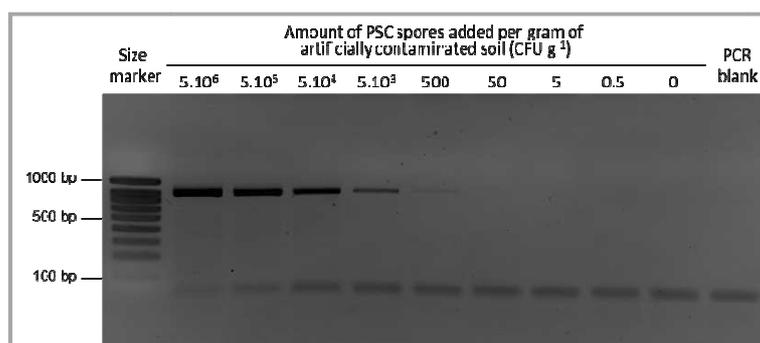
**Figure 4.** Conventional PCR amplification using the primer pair NS7/Scedo1 with DNA extracts from sterilized and non-sterilized loam.

In the present study, the PowerSoil® DNA isolation kit and the E.Z.N.A.® soil DNA kit were the only kits able to reproducibly extract amplifiable DNA from loam samples artificially contaminated with PSC spores. Indeed, ITS PCR amplicons were detected after the ITS pan-

fungus PCR in all extracts from artificially contaminated and non-contaminated soil samples obtained with the PowerSoil® DNA isolation kit and in five extracts from artificially contaminated soil samples obtained with the E.Z.N.A.® soil DNA kit (Table 2). PSC DNA was specifically amplified in four PowerSoil® DNA isolation kit extracts (Figure 5) and E.Z.N.A.® soil DNA kit extracts obtained from artificially contaminated soil samples ( $5.10^6$ ,  $5.10^5$ ,  $5.10^4$  and  $5.10^3$  of PCS spores). No amplification of either filamentous fungi or PCS DNA was obtained from soil extracts obtained with the FastDNA SPIN® kit and the NucliSENS EasyQ® basic kit (Table 2), although DNA extracts obtained with these kits could be quantified using a Nanodrop spectrophotometer at 260 nm (data not shown).

**Table 2.** Conventional PCR using the sets of primers ITS4/ITS5 and NS-7/Scedo1 with DNA extracted from artificially contaminated soils.

DNA extraction kits	Conventional PCR	Amount of PSC spores added per gram of artificially contaminated soil (CFU g <sup>-1</sup> )									PCR blank
		5.10 <sup>6</sup>	5.10 <sup>5</sup>	5.10 <sup>4</sup>	5.10 <sup>3</sup>	500	50	5	0.5	0	
PowerSoil® DNA isolation kit	ITS4/ITS5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	NS7/Scedo1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
E.Z.N.A.® soil DNA kit	ITS4/ITS5	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	NS7/Scedo1	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
FastDNA SPIN® kit for soil	ITS4/ITS5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NS7/Scedo1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NucliSENS EasyQ® basic kit	ITS4/ITS5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	NS7/Scedo1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



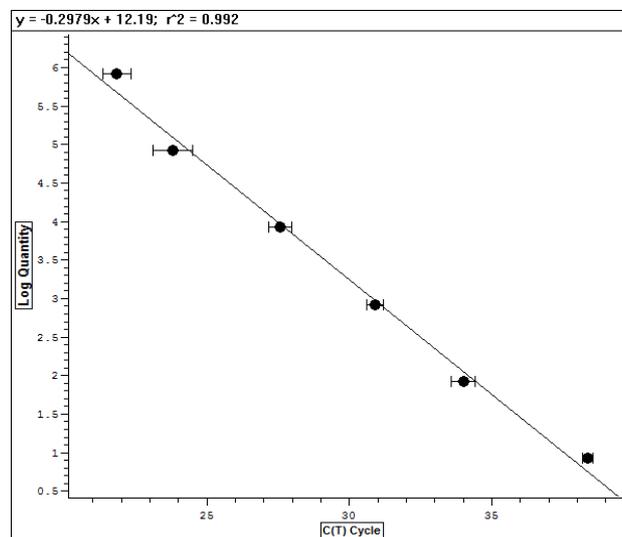
**Figure 5.** Conventional PCR amplification using the primer pair NS-7/Scedo1 with DNA extracts from artificially contaminated soils obtained with the PowerSoil® DNA isolation kit.

The PowerSoil® DNA isolation kit and the E.Z.N.A.® soil DNA kit removed more efficiently PCR inhibitors such as humic acids. These results are in agreement with previous studies (Dineen *et al.*, 2010; Mahmoudi *et al.*, 2011). Nevertheless, the PowerSoil® DNA isolation kit

revealed to be more efficient than the E.Z.N.A.<sup>®</sup> soil DNA kit in extracting DNA of filamentous fungi, and was therefore selected for further experiments.

*Real-time PCR analysis of DNA extracts obtained from artificially contaminated soil samples*

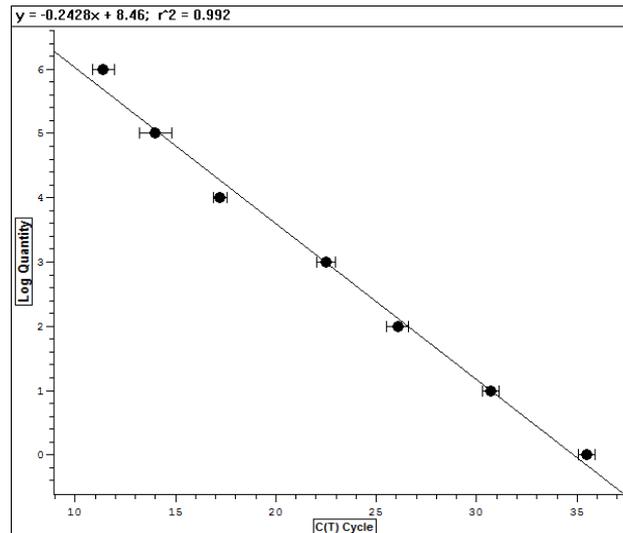
Mean CT values of 21.98 ( $\pm$  0.46), 23.91 ( $\pm$  0.71), 27.76 ( $\pm$  0.35), 31.03 ( $\pm$  0.19), 34.18 ( $\pm$  0.36), and 37.10 ( $\pm$  0.00) were obtained for DNA extracts obtained with the PowerSoil<sup>®</sup> DNA isolation kit from soil samples artificially contaminated with  $5.10^6$ ,  $5.10^5$ ,  $5.10^4$ ,  $5.10^3$ , 500 and 50 PSC spores, respectively. The coefficient ( $R^2$ ) of the linear regression was 0.992. Amplification efficiency ( $10^{[\text{slope}]} - 1$ ) was 98 % (Fig. 6).



**Figure 6.** Standard curve obtained for DNA extracts with the real-time PCR assay CALR1/CALF1/probe CAL.

DNA extracts were obtained with the PowerSoil<sup>®</sup> DNA isolation kit from soil samples artificially contaminated with different amounts of PSC spores ( $5.10^6$  to 50).

In order to improve sensibility of our assay, a pre-amplification of the CAL sequence of fungal DNA was tested. A nested-PCR consisting of a CL1/CL2a PCR amplification (15 cycles) followed by the real-time quantitative PCR (CALR1/CALF1/probe CAL) was realized. Mean CT values were 11.41 ( $\pm$  0.29), 14.02 ( $\pm$  0.54), 17.21 ( $\pm$  0.09), 22.54 ( $\pm$  0.23), 26.06 ( $\pm$  0.28), 30.75 ( $\pm$  0.16), and 35.47 ( $\pm$  0.16) for DNA extracts obtained with the PowerSoil<sup>®</sup> DNA isolation kit from soil samples artificially contaminated with  $5.10^6$ ,  $5.10^5$ ,  $5.10^4$ ,  $5.10^3$ , 500, 50 and 5 PSC spores, respectively. The coefficient ( $R^2$ ) of the linear regression was 0.992. Amplification efficiency ( $10^{[\text{slope}]} - 1$ ) was 75 % (Fig. 7).



**Figure 6.** Standard curve obtained for DNA extracts with nested-PCR CL1/CL2a followed by the real-time PCR assay CALR1/CALF1/probe CAL.

DNA extracts were obtained with the PowerSoil® DNA isolation kit from soil samples artificially contaminated with different amount of PSC spores ( $5 \cdot 10^6$  to 5).

Finally, our real-time PCR assay (CALR1/CALF1/probe CAL) in combination with the PowerSoil® DNA isolation kit was applied on samples of soil. However, no signal was obtained with DNA extracts from any soil samples although some of them were culture-positive for PSC using the Scedo-Select III culture medium. This disappointing result may be explained by the low density of PSC in soil samples contrasting with that of other filamentous fungi. Indeed, even if our real-time PCR assay is sensitive (50 spores without the CAL pre-amplification), we tested it on loam samples artificially contaminated with only PSC spores. The fungal burden in soil samples may be too important for our real-time PCR assay. Moreover, tests of the real-time PCR assay were realized with artificially contaminated loam, not with soil samples, and one may speculate the presence in soil samples of different PCR inhibitors. Experiments will be conducted in a next future using a first concentration step of fungal elements.

## Acknowledgements

This work was supported by a grant from the University of Angers (Angers, France).

## References

- Anastasi A, Varese GC, Marchisio VF (2005) Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia* **97**: 33–44
- Bouchara JP, Hsieh HY, Croquefer S, Barton R, Marchais V, Pihet M, Chang TC (2009) Development of an oligonucleotide array for direct detection of fungi in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **47**: 142–152
- Castelli MV, Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M (2008) Development and validation of a quantitative PCR assay for diagnosis of scedosporiosis. *J Clin Microbiol* **46**: 3412–3416
- Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, et al (2008) Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev* **21**: 157–197
- Davis TN, Urdea MS, Masiarz FR, Thorner J (1986) Isolation of the yeast calmodulin gene: calmodulin is an essential protein. *Cell* **47**: 423–431
- Dineen SM, Aranda R 4th, Anders DL, Robertson JM (2010) An evaluation of commercial DNA extraction kits for the isolation of bacterial spore DNA from soil. *J Appl Microbiol* **109**: 1886–1896
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J (2005) Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* **43**: 4930–4942
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J (2009) Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med Mycol* **47**: 371–374
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J (2008) Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol* **46**: 766–771
- Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, Carrère J, Degand N, Mely L, Favennec L, Dannaoui E, Bouchara JP, Calenda A (2010) *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **48**: 2381–2386
- Harun A, Gilgado F, Chen SCA, Meyer W (2010) Abundance of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways in cystic fibrosis. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S70–76
- de Hoog GS, Marvin-Sikkema FD, Lahpoor GA, Gottschall JC, Prins RA, Guého E (1994) Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses* **37**: 71–78
- Kaltseis J, Rainer J, de Hoog GS (2009) Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol* **47**: 398–405

- Kuske, Banton, Adorada, Stark, Hill, Jackson (1998) Small-Scale DNA sample preparation method for field PCR detection of microbial cells and spores in soil. *Appl Environ Microbiol* **64**: 2463–2472
- Lau A, Sorrell TC, Chen S, Stanley K, Iredell J, Halliday C (2008) Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens. *J Clin Microbiol* **46**: 3021–3027
- Mahmoudi N, Slater GF, Fulthorpe RR (2011) Comparison of commercial DNA extraction kits for isolation and purification of bacterial and eukaryotic DNA from PAH-contaminated soils. *Can J Microbiol* **57**: 623–8
- Pham T, Giraud S, Rougeron A, Pihet M, Calenda A, Bouchara JP (2010) Scedo-Select III: a new semi-selective culture medium for environmental studies. Third meeting of the ECMM/ISHAM Working group on *Pseudallescheria/Scedosporium* infections. Bonn, Allemagne.
- Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, Summerbell RC (2008) Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**: 315–322
- Rasmussen CD, Means RL, Lu KP, May GS, Means AR (1990) Characterization and expression of the unique calmodulin gene of *Aspergillus nidulans*. *J Biol Chem* **265**: 13767–13775
- Summerbell RC, Krajden S, Kane J (1989) Potted plants in hospitals as reservoirs of pathogenic fungi. *Mycopathologia* **106**: 13–22
- Tsai YL, Olson BH (1991) Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol* **57**: 1070–1074
- Wedde M, Müller D, Tintelnot K, de Hoog GS, Stahl U (1998) PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria/Scedosporium* strains. *Med Mycol* **36**: 61–67
- Zhou X, Kong F, Sorrell TC, Wang H, Duan Y, Chen SCA (2008) Practical method for detection and identification of *Candida*, *Aspergillus*, and *Scedosporium* spp. by use of rolling-circle amplification. *J Clin Microbiol* **46**: 2423–2427
- Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S (2013) Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* **51**: 603–13

**DISCUSSION GENERALE**  
**&**  
**PERSPECTIVES**

La mucoviscidose est la plus fréquente des maladies génétiques autosomiques récessives dans la population caucasienne. Bien que tous les organes possédant un tissu épithélial soient touchés, le pronostic est essentiellement dominé par l'atteinte respiratoire. L'hyperviscosité du mucus bronchique freine la clairance mucociliaire des patients CF et fournit un environnement propice au développement des germes inhalés. Cette colonisation des voies respiratoires est à l'origine d'une réaction inflammatoire qui conduit progressivement à l'altération de la fonction respiratoire. Les bactéries sont les principaux agents responsables d'infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose. Les progrès réalisés en termes de prévention et de traitement des infections bactériennes se sont malheureusement accompagnés d'une augmentation de la fréquence des infections d'origine fongique. En effet, à un stade plus avancé de la maladie, les voies respiratoires des patients sont colonisées par des champignons filamenteux, notamment le complexe d'espèces *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* qui se situe au deuxième rang avec une fréquence comprise entre 2% et 17,4%, après *Aspergillus fumigatus*.

A la suite des travaux de Gilgado *et al.* (2005, 2008, 2009) qui ont conduit à la reconnaissance de *Scedosporium apiospermum* comme un complexe d'espèces comprenant au moins cinq espèces distinctes (*S. aurantiacum*, *P. minutispora*, *S. dehoogii*, *S. apiospermum sensu stricto* et *P. boydii sensu lato*), différents auteurs ont établi que ces espèces ne présentaient pas les mêmes degrés de virulence, ni les mêmes profils de sensibilité aux antifongiques (Gilgado *et al.*, 2005; Gilgado *et al.*, 2008; Gilgado *et al.*, 2009; Lackner *et al.*, 2011; Lackner *et al.*, 2012). Néanmoins, l'épidémiologie et la pathogénicité de ces espèces sont encore aujourd'hui peu documentées.

Comme nous l'avons exposé précédemment, les scédosporioses consistent en des infections localisées (comme les mycétomes) survenant chez les individus immunocompétents suite à l'inoculation traumatique de matériel fongique présent dans l'environnement; des infections respiratoires résultant de l'inhalation de spores par des patients au tractus respiratoire altéré comme les patients atteints de mucoviscidose; ou encore des infections disséminées concernant le plus souvent des patients immunodéprimés.

Pour disposer d'une quantité plus importante de données épidémiologiques sur la distribution des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* dans les différents types d'infections qu'il peut provoquer, il serait nécessaire d'identifier systématiquement au rang d'espèces les isolats collectés à partir de l'analyse des échantillons cliniques. Cette identification est à l'heure actuelle relativement fastidieuse puisqu'elle nécessite le

séquençage d'un à deux loci du génome de ces isolats. Ceci nécessite du temps, une certaine expérience et des moyens importants. De plus, se pose la question de l'intérêt pour les cliniciens. En effet, différents profils de sensibilité aux antifongiques peuvent être obtenus pour les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, mais aussi pour différents génotypes d'une même espèce (Lackner *et al.*, 2012). Si l'identification au rang d'espèces ne permet pas d'orienter le choix de la stratégie thérapeutique, elle n'en reste pas moins informative sur un plan épidémiologique et phylogénétique. En effet, à partir des isolats stockés dans les différentes collections européennes (CBS, Institut Pasteur, Université d'Angers, ...), une identification rétrospective au rang d'espèces répondrait à de nombreuses questions épidémiologiques. Ainsi, les espèces supposées rares en clinique ne le seraient peut-être pas autant qu'estimé aujourd'hui. De même, il serait possible de mettre en évidence éventuellement de nouvelles espèces, voire, en menant des analyses de population, des recombinaisons entre les espèces actuellement décrites. Enfin, une pathogénicité particulière de certaines de ces espèces pourrait être mise en évidence. Le développement des nouvelles technologies, comme les spectrométries de masse de type MALDI-TOF/MS ou de type ESI-TOF/MS après PCR, permettra certainement dans un futur proche de répondre à ses problématiques épidémiologiques.

Face à ces interrogations, nous nous sommes proposée de déterminer la fréquence respective des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* dans le contexte de la mucoviscidose à partir de 68 isolats collectés d'expectorations ou d'aspirations bronchiques de 50 patients CF suivis dans 12 hôpitaux de France (Etude 1).

L'analyse phylogénétique des séquences nucléotidiques de quatre régions de l'ADN génomique a mis en évidence quatre clusters principaux correspondant aux espèces *S. aurantiacum*, *P. minutispora*, *S. apiospermum* et *P. boydii*, cette dernière montrant la plus grande variabilité et comportant le sous-groupe *P. ellipsoidea*. Nous avons établi qu'en France, dans le contexte de la mucoviscidose, *P. boydii* est l'espèce prédominante (62%), suivie de *S. apiospermum* (24%) et *S. aurantiacum* (10%). *Pseudallescheria minutispora* n'a été isolée que pour deux patients (4%) et *S. dehoogii* n'a pas été retrouvé.

En Espagne, les prévalences respectives des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* toutes formes cliniques confondues semblent proches de ce que nous avons identifié pour les patients CF puisque *P. boydii* prédomine largement (61,5%), suivie de *S. apiospermum* (23%). *Scedosporium aurantiacum* et *S. dehoogii* n'ont été retrouvés que pour un seul patient chacun (7,7%), et *P. minutispora* n'a pas été isolé (Lackner *et al.*, 2011).

En revanche, nos résultats diffèrent de ceux obtenus à partir d'un panel d'isolats provenant d'Autriche et d'Allemagne (Kaltseis *et al.*, 2009). Dans cette étude, *S. apiospermum* était l'espèce prédominante (57%), suivie de *P. boydii* (33,5%). *Scedosporium aurantiacum*, *P. minutispora* et *S. dehoogii* étaient quant à elles, rarement retrouvées comme dans notre étude (6,1%, 2,2% et 1,1%, respectivement). En Australie, la distribution des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* est encore différente. Avec 48% des isolats, *S. aurantiacum* représente l'espèce dominante dans ce pays. *Scedosporium apiospermum* représenterait 52% des isolats (Delhaes *et al.*, 2008). Cependant, n'ayant été identifiés que par séquençage des régions ITS, nous ne pouvons écarter l'hypothèse que ces isolats pourraient correspondre à d'autres espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. L'ensemble de ces observations suggère que la distribution des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* dans l'environnement varie d'un pays à l'autre, voire d'une région à l'autre au sein d'un même pays (Zouhair *et al.*, 2013).

Contrairement à *A. fumigatus* qui est omniprésent dans l'environnement, le complexe d'espèces *P. boydii* / *S. apiospermum* est retrouvé de manière sporadique dans l'environnement, son isolement étant, dans la majorité des études, totalement fortuit. L'identification des niches naturelles et des réservoirs de ces espèces constituant des sources potentielles de contamination humaine a fait l'objet de notre seconde étude, étude au cours de laquelle nous nous sommes proposés de préciser l'écologie de ce complexe dans les environs d'Angers, et plus largement dans la région des Pays-de-la-Loire.

Les quantités les plus importantes d'isolats du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* ont été retrouvées dans les zones impactées par les activités humaines, à savoir les zones agricoles, les boues de stations d'épuration, les aires de jeux et les zones industrielles. A l'inverse, de faibles quantités d'isolats ont été rencontrées dans les zones viticoles et aucun membre de ce complexe n'a été isolé des habitats naturels que constituent les forêts.

Au cours de cette étude, *Scedosporium dehoogii* s'est avéré l'espèce prédominante puisque qu'elle représente 40% des isolats que nous avons identifiés. Cette proportion est largement différente de celles obtenues en Autriche et en Australie où *S. dehoogii* représentait 20% et < 1% des isolats collectés dans ces pays, respectivement. Cette espèce a été retrouvée dans toutes les zones impactées par les activités humaines, en accord avec les résultats obtenus en Autriche par Kaltseis *et al.* (2009). Ainsi, 67%, 50% et 40% des prélèvements réalisés en zones agricoles, dans des stations d'épuration ou en zones industrielles, respectivement, ont révélé la présence de *S. dehoogii*. Pour ces deux derniers biotopes, il est à noter que cette

espèce représentait 50% des isolats appartenant au complexe d'espèces *P. boydii* / *S. apiospermum*. Cette abondance de *S. dehoogii* dans l'environnement est tout à fait remarquable puisque seuls quelques isolats cliniques de cette espèce ont été cités dans la littérature (Gilgado *et al.*, 2005; Lackner *et al.*, 2011; Lackner *et al.*, 2012) lors d'études de phylogénie ou de sensibilités aux antifongiques des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. Ces isolats provenaient d'expectorations (un patient CF et un patient atteint de nocardiose pulmonaire) ou de prélèvements cutanés. Il est légitime de douter du caractère pathogène de ces isolats puisque nous ne pouvons éliminer l'hypothèse d'une contamination des prélèvements par des éléments telluriques lors de leur réalisation ou d'un portage transitoire. De plus, les auteurs ne fournissant pas suffisamment de données sur les patients pour lesquels ces isolats ont été identifiés, nous ne pouvons affirmer qu'ils sont différents, les mêmes isolats ont ainsi pu être utilisés au cours de différentes études. Des modèles murins de scédosporioses invasives (injection intraveineuse de spores à des souris immunocompétentes ou immunodéficientes) ont établi que *S. dehoogii* est l'une des espèces les plus virulentes du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* (Gilgado *et al.*, 2009). Des travaux complémentaires seraient nécessaires pour évaluer la capacité de *S. dehoogii* à s'implanter chez l'hôte, par exemple des expériences *in vitro* d'adhésion cellulaire ou *in vivo* dans des modèles de scédosporiose pulmonaire. L'idéal serait de disposer de modèles immunocompétents présentant un tractus respiratoire altéré, comme les souris homozygotes déficientes pour le gène *CFTR*. Ce modèle murin est cependant assez éloigné de l'homme, et différentes équipes de recherche tentent de développer un modèle porcin *CFTR* *-/-*, mais à ce jour, la survie des individus atteints à la naissance est limitée (Rogers *et al.*, 2008). De manière surprenante, *S. dehoogii* abondamment retrouvé dans les zones que nous avons explorées, n'a pas été isolé des zones viticoles. Sur ce point, l'analyse statistique que nous avons menée pour évaluer les éventuelles associations entre les zones explorées et la flore microbienne identifiée pour chacune suggère qu'il pourrait exister des antagonismes entre les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* et les autres espèces en présence. Ainsi, les zones viticoles sont définies par la présence d'*Aspergillus niger* et de *Cunninghamella* sp. et l'absence de *S. dehoogii*. Des expériences de co-cultures de ces espèces permettraient de mettre en évidence un éventuel antagonisme entre celles-ci. Toutefois, *A. niger* et *Cunninghamella* sp. sont des champignons filamenteux à croissance extensive et de par leur abondance dans les zones viticoles, elles peuvent avoir masqué la présence de *S. dehoogii*. Ceci pourrait expliquer également la faible densité d'espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* dans ces zones. Une autre explication à cette faible densité peut également être l'utilisation de produits chimiques particuliers (fongicides,

antibiotiques, insecticides, ...) dans les zones viticoles qui auraient un effet néfaste sur le développement des espèces de ce complexe.

La proportion de *S. aurantiacum* que nous avons observée (20% des isolats collectés), diffère de manière importante de celle observée en Autriche où cette espèce représente 6,4% des isolats collectés (Kaltseis *et al.*, 2009) et en Australie où elle représente 54,6% des isolats des genres *Pseudallescheria* / *Scedosporium* et 96% des isolats du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* (Harun *et al.*, 2010). Au cours de nos travaux, nous avons obtenu une association significative entre la présence de *S. aurantiacum* et les zones agricoles, ce qui n'avait jamais été décrit auparavant. En effet, 72% des prélèvements réalisés dans ces zones ont révélé la présence de cette espèce. Il est remarquable de constater que 75% des *S. aurantiacum* que nous avons collectés, l'ont été de zones agricoles. De plus, contrairement à la fréquence importante de *S. aurantiacum* mise en évidence dans les zones urbaines en Australie (Harun *et al.*, 2010), aucun isolat de cette espèce n'a été retrouvé dans nos prélèvements que ce soit dans les parcs urbains, les aires de jeux ou les zones industrielles. Les variations importantes dans la distribution de *S. aurantiacum* d'un pays à l'autre pourraient reposer sur des différences de climat et/ou de pratiques agricoles. La faible fréquence de *S. aurantiacum* observée au cours de notre étude dans le contexte de la mucoviscidose pourrait s'expliquer aussi par le fait que cette espèce, tout au moins en France, serait associée à une niche écologique particulière, à savoir les zones agricoles. Ainsi, la contamination des patients CF pourrait être un phénomène essentiellement rural. Ceci pourrait être exploré en intégrant la donnée « vie en milieu rural / vie en milieu urbain » dans les caractéristiques géographiques des patients CF pour l'analyse statistique de la distribution des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*.

Contrairement aux études environnementales réalisées en Autriche et en Australie (Kaltseis *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2010) dans lesquelles *P. boydii* n'a été que faiblement retrouvé (2% et 3,5% des isolats du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, respectivement), cette espèce correspondait à 20% des isolats du complexe que nous avons pu identifier. *Pseudallescheria boydii* est distribué de manière constante entre les différentes zones explorées (sauf les forêts, négatives pour les espèces du complexe). Toutefois, une forte proportion (50%) des prélèvements réalisés en zones agricoles et des boues collectées dans les stations d'épuration ont révélé sa présence. De plus, cette espèce semble présenter une certaine affinité pour les bords de mer puisque qu'elle représente 85% des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* isolées dans cette zone. Le caractère ubiquitaire de *P. boydii* dans

l'environnement en France pourrait expliquer sa forte fréquence dans le contexte de la mucoviscidose.

La proportion de *S. apiospermum* que nous avons identifiée à partir de la totalité des isolats collectés (20%), diffère elle aussi de celle observée en Autriche, pays où cette espèce est largement prédominante (70% des isolats) (Kaltseis *et al.*, 2009) ou à l'inverse en Australie où aucun isolat n'a été retrouvé (Harun *et al.*, 2010). En revanche, une association significative entre *S. apiospermum* et les aires de jeux a pu être mise en évidence. En effet, 50% des prélèvements de cette zone ont révélé sa présence et cette espèce représentait 58% des espèces du complexe collectées dans cette zone. Ceci suggère que les sols des aires de jeux peuvent constituer un réservoir non négligeable d'espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* et une source de contamination pour les patients CF. *Scedosporium apiospermum* n'étant pas aussi ubiquitaire que *P. boydii*, sa fréquence bien moindre au cours de la mucoviscidose ne semble pas surprenante. De plus, bien que le risque de scédosporioses faisant suite à l'aspiration d'eaux usées, très polluées, stagnantes ou boueuses, comme dans les phénomènes de presque-noyades, soit bien connu, nous n'avons pas identifié de manière surprenante *S. apiospermum* dans les zones en contact avec l'eau (berges de rivières et bords de mer). Ceci laisse à penser que *S. apiospermum* ne serait pas l'espèce prédominante dans les scédosporioses cérébrales sur presque noyade en France, les cas reportés dans ces conditions étant antérieurs aux changements survenus dans la classification.

Enfin, un seul isolat de *P. minutispora* a été mis en évidence dans une aire de jeux. Bien que cette espèce soit connue pour être environnementale du fait du caractère exceptionnel des infections à cette espèce (Lu *et al.*, 2011b), une question émerge de ce travail quant à ses niches écologiques. En effet, nous avons exploré une grande diversité de sols présentant différents pH et différentes flores microbiennes sans pour autant retrouver cette espèce. Des résultats similaires ont été observés en Autriche et en Australie (Kaltseis *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2010). Toutefois, sa fréquence a pu être sous-estimée. En effet, même si cette espèce est capable de croître à 37°C, tolérant même une température de 40°C (Gilgado *et al.*, 2008), nous avons observé que les colonies de *P. minutispora* présentaient un diamètre supérieur à 25°C. Dans notre étude, nous avons utilisé le milieu YPDA incubé à 25°C et à 37°C, alors que le milieu Scedo-Select III a été incubé seulement à 37°C.

Dans le contexte de la mucoviscidose, les patients font l'objet d'une surveillance toute particulière. Outre l'évaluation régulière de l'aspect clinique de la maladie (intensité de la toux, aspect de la bronchorrhée, courbe staturo-pondérale, ...), de la fonction respiratoire (Volume expiratoire maximal par seconde ou Forced expiratory volume, VEMS ou FEV1) et des données biologiques (numération de formule sanguine, ...), l'examen microbiologique itératif des expectorations est une analyse primordiale pour la mise en évidence des germes piégés dans le mucus bronchique des patients CF. Lorsque ces germes ne sont pas commensaux, il est important de distinguer un portage transitoire d'une colonisation chronique.

A la manière des espèces du genre *Aspergillus* (de Valk *et al.*, 2009; Rougeron *et al.*, 2013), *P. boydii* et *S. apiospermum* sont capables de coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (Defontaine *et al.*, 2002; Gilgado *et al.*, 2005). Lors de l'étude que nous avons réalisée sur la prévalence des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, nous disposions d'isolats multiples (provenant d'un même prélèvement) ou séquentiels (issus de prélèvements successifs effectués chez un même patient) pour deux patients colonisés l'un par *P. minutispora* (P14) et l'autre par *S. aurantiacum* (patient P3).

Pour le patient P14, nous avons décrit le premier isolement de *P. minutispora* dans le contexte de la mucoviscidose et démontré que cette espèce est capable de coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients CF. En effet, un même génotype a pu être identifié à partir de trois expectorations du patient P14 avec un délai de 15 mois entre la première et la dernière. Précédemment, seule une détection par méthode moléculaire (PCR-RLB pour *Reverse Line Blot hybridization*) avait permis de mettre en évidence *P. minutispora* à partir d'une expectoration d'un patient CF sans que l'analyse mycologique réalisée en parallèle ne permette l'isolement de cette espèce (Lu *et al.*, 2011b).

Pour le patient P3, nous disposions de 16 isolats obtenus à partir de neuf expectorations. Ce patient présentait un premier épisode de colonisation chronique par *P. boydii*. Néanmoins, deux génotypes différents ont été identifiés, l'un persistant pendant 15 mois et l'autre isolé de manière transitoire. Ce patient a ensuite présenté un deuxième épisode de colonisation chronique, par une autre espèce du complexe, *S. aurantiacum*. Trois génotypes ont alors été identifiés, l'un d'entre eux persistant pendant 3 ans et demi (Figure 25 et Tableau 8).

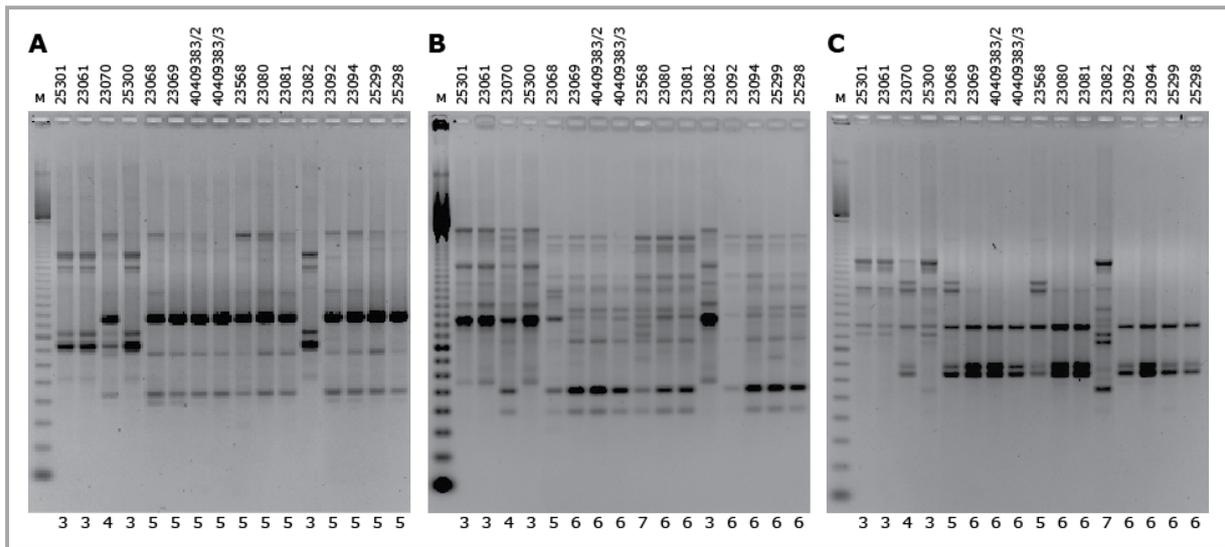


Figure 25 : Profil RAPD obtenu pour les isolats collectés à partir du patient P3 avec les amorces GC70 (A), UBC701 (B) et UBC703 (C).

Les numéros IHEM ou de notre collection sont reportés au-dessus des puits. Les génotypes correspondants sont notés au-dessous de la figure.

Tableau 8 : Génotypes RAPD et identification moléculaire des isolats collectés à partir du patient P3.

Date de prélèvement	Numéro IHEM**	Génotype RAPD*			Génotype global RAPD	Identification moléculaire
		GC70	UBC701	UBC703		
2002/09/02	25301	3	3	3	3	
	23061	3	3	3	3	<i>Pseudallescheria boydii</i>
2003/06/18	23070	4	4	4	4	<i>Pseudallescheria boydii</i>
2003/10/31	25300	3	3	3	3	
2003/12/18	23068	5	5	5	5	<i>Scedosporium aurantiacum</i>
2004/12/01	23069	5	6	6	6	
	40409383/2***	5	6	6	6	
	40409383/3***	5	6	6	6	
2005/05/23	23568	5	7	5	7	<i>Scedosporium aurantiacum</i>
2005/10/03	23080	5	6	6	6	<i>Scedosporium aurantiacum</i>
	23081	5	6	6	6	
	23082	3	3	7	8	<i>Pseudallescheria boydii</i>
2006/08/03	23092	5	6	6	6	
	23094	5	6	6	6	
2007/06/06	25299	5	6	6	6	
	25298	5	6	6	6	

\*RAPD : Random Amplification of Polymorphic DNA ; \*\*IHEM : Institute of Hygiene and Epidemiology, Mycology section ; \*\*\*isolats conservés dans notre collection.

L'identification de trois génotypes de *S. aurantiacum* par RAPD à partir de 12 isolats collectés sur une période de 3,5 ans souligne la grande variabilité génétique de cette espèce, phénomène déjà observé au cours d'une large étude de génotypage de souches de *Scedosporium* isolées en Australie (Delhaes *et al.*, 2008). Néanmoins, le fait que ces trois génotypes présentent des profils très proches suggèrent un phénomène de micro-évolution dans les voies aériennes de ce patient CF. Ce phénomène a déjà été mis en évidence pour de nombreux micro-organismes, comme *A. fumigatus* (Vanhee *et al.*, 2008; Araujo *et al.*, 2009), *Aspergillus terreus* (Rougeron *et al.*, 2013), *Aspergillus flavus* (Rudramurthy *et al.*, 2011), *Exophiala dermatitidis* (Packeu *et al.*, 2012) et *Candida albicans* (Muthig *et al.*, 2010).

Parmi ces trois génotypes de *S. aurantiacum*, il semblerait que seul le génotype 6 soit capable de persister dans les voies respiratoires du patient. Ceci nous conduit à formuler l'hypothèse de l'existence de caractéristiques intrinsèques rendant certains isolats capables de coloniser de manière chronique les patients CF. Des éléments de réponse pourraient être apportés par la réalisation des tests *in vitro* de compétitivité de différents génotypes lors de co-cultures et/ou d'adhérence aux cellules épithéliales mutées ou non pour le gène *CFTR*.

Il est intéressant de noter que pour une même date de prélèvement (le 3 octobre 2005), deux espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* ont pu être identifiées pour le patient P3 (Tableau 8). Ceci souligne l'importance de collecter et de stocker plusieurs colonies (avec un maximum de cinq colonies par échantillon) lors de l'analyse mycologique des expectorations.

A ce jour, grâce à notre étude et à des travaux antérieurs, il est établi que les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* (exception faite de *S. dehoogii*) sont capables de coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients CF. Or, la signification clinique d'un tel phénomène est assez peu documentée et reste, comme pour *A. fumigatus* sujette à débat. En effet, certains auteurs associent la colonisation chronique des voies respiratoires par *A. fumigatus* à une augmentation du risque d'exacerbations pulmonaires nécessitant une hospitalisation (Amin *et al.*, 2010) et de survenue d'infections chroniques à *Pseudomonas aeruginosa* (Paugam *et al.*, 2010), tandis que d'autres ont montré qu'elle n'augmentait pas le risque de dégradation pulmonaire (Milla *et al.*, 1996) et n'était pas liée à la survenue d'ABPA (Chotirmall *et al.*, 2008; Paugam *et al.*, 2010).

Concernant les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, pour la plupart des patients, aucune relation entre la colonisation chronique et le statut clinique n'a pu être établie. Néanmoins, de manière surprenante, il a été montré que les patients CF colonisés par les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* présenteraient un risque plus important de manifester une ABPA que les patients CF non-colonisés. Toutefois, ceci doit être nuancé puisque ces espèces peuvent elles-mêmes provoquer des mycoses broncho-pulmonaires allergiques ou ABPM (Lake *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1993; Cimon *et al.*, 2000). De plus, des résultats antérieurs ont permis de mettre en évidence que l'immunosuppression instaurée des suites d'une greffe pulmonaire, ultime recours thérapeutique permettant de prolonger la vie de patients, constitue un facteur de risque de recolonisation des voies respiratoires des patients CF qui étaient, avant transplantation, colonisés par les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. Ce phénomène semble rare (Morin *et al.*, 1999; Symoens *et al.*, 2006; Borghi *et al.*, 2010; Morio *et al.*, 2010; Hirschi *et al.*, 2012), mais, une colonisation chronique par ces espèces peu sensibles aux antifongiques actuellement disponibles pourrait constituer une contre-indication à la transplantation pulmonaire. Enfin, il est à noter que les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, de la même façon que *A. fumigatus*, ne sont pas des champignons commensaux du tractus respiratoire. Elles pourraient contribuer à l'exacerbation de la réaction inflammatoire et ainsi participer à la détérioration progressive de la fonction pulmonaire.

S'il est difficile d'établir des relations entre la colonisation chronique par les champignons filamenteux et les manifestations cliniques des patients CF, ceci pourrait s'expliquer en partie par le fait qu'aucune définition n'est véritablement formulée et acceptée par la communauté scientifique. Nombre d'études ont considéré l'isolement répétitif d'une espèce fongique comme une colonisation chronique. Or, nous devons prendre en considération le ou les génotypes impliqués pour pouvoir éventuellement identifier des profils de colonisation. A titre d'illustration dans le cadre de notre étude sur la colonisation des voies respiratoires des patients CF par *A. terreus*, trois profils de colonisation ont été observés : (i) une colonisation chronique par un génotype prédominant ; (ii) une colonisation prolongée par deux génotypes distincts détectés simultanément ; et (iii) une colonisation transitoire par des génotypes toujours différents (Rougeron *et al.*, 2013). Ce dernier profil aurait pu être considéré comme une colonisation chronique si notre étude s'était limitée à l'isolement culturel des espèces et n'avait pas été associée à un génotypage par microsatellites.

Dans notre étude, nous avons démontré que *S. aurantiacum* et *P. minutispora* étaient capables de coloniser les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose grâce à la technique RAPD développée par Zouhair *et al.* (2000). Cette méthode nécessitant trois amorces (GC70, UBC701 et UBC703) est rapide, simple de réalisation et peu coûteuse (appareillage et réactifs) et présente un fort pouvoir discriminant pour les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. En revanche, elle est faiblement reproductible aussi bien au sein du même laboratoire que d'un laboratoire à un autre et les profils de migration peuvent s'avérer difficiles à interpréter. Tout récemment, deux méthodes basées sur la technique de séquençage multi-loci ont été proposées, l'une pour le génotypage d'isolats de *S. apiospermum* et de *P. boydii* (Bernhardt *et al.*, 2013), l'autre pour *S. aurantiacum* (Harun *et al.*, en soumission). Bernhardt et ses collaborateurs (2013) ont mis en évidence, grâce à cette méthode, la persistance de certains génotypes pendant plusieurs années. Toutefois, il faudrait inclure un nombre plus important d'isolats par patient CF ainsi que de patients CF, et intégrer la donnée « examen mycologique des crachats négatif » pour identifier des profils de colonisation par ces espèces. Il serait aussi possible de mettre en évidence la capacité des patients à éliminer certains génotypes de leurs voies respiratoires et savoir ainsi si un nouvel isolement de ces espèces correspond à une nouvelle colonisation, ce qui impliquerait un nouveau contact avec la source de contamination. De plus, grâce au séquençage des génomes complets des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*, il sera possible dans un futur proche de développer une méthode d'analyse des microsatellites pour chacune des espèces de ce complexe, comme cela a déjà été réalisé pour *A. fumigatus* (Vanhee *et al.*, 2008; de Valk *et al.*, 2009) et *A. terreus* (Rougeron *et al.*, 2013), notamment pour les patients CF. Avec le développement d'outils de génotypage aussi performants, une étude de souches cliniques et environnementales répondrait à différentes problématiques : (i) l'existence ou non de clusters géographiques ; (ii) l'identification potentielle de sources de contamination si certains génotypes sont partagés par des isolats environnementaux et cliniques ; (iii) des profils de colonisation particuliers selon la situation géographique des patients ou les mutations de leur gène *CFTR*.

La détection du complexe *S. apiospermum* / *P. boydii* est aujourd'hui basée sur l'utilisation de milieux de culture semi-sélectifs permettant la croissance de ces espèces et inhibant partiellement ou totalement celle de champignons filamenteux à croissance extensive. Même si la préparation de ces milieux a été simplifiée au fil des années, le délai d'obtention de colonies des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* reste de minimum sept jours. Les méthodes basées sur la quantification de l'ADN des micro-organismes étant plus rapides et plus sensibles, nous nous sommes proposée de développer une méthode moléculaire pour la détection et la quantification des espèces du complexe *S. apiospermum* / *P. boydii* à partir d'échantillons de sol.

Nous avons dans un premier temps développé une PCR quantitative spécifique des cinq espèces de ce complexe. Cette technique présente un seuil de sensibilité de 100 fg d'ADN extrait de culture pure (soit moins de 10 génomes) et une efficacité de 94%. Cependant, l'amplification de *P. minutispora* était plus tardive que celle des autres espèces et pourrait être améliorée. En effet, seules deux séquences de cette espèce ont été alignées pour l'obtention de la séquence consensus ayant permis l'élaboration des amorces et de la sonde d'hydrolyse. Or, les séquences nucléotidiques d'un locus peuvent différer entre les isolats d'une même espèce. Depuis la réalisation de l'étude de la distribution des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* dans le contexte de la mucoviscidose, nous disposons de séquences supplémentaires du locus CAL de *P. minutispora*. La prise en compte de ces séquences dans l'alignement global nous permettrait peut-être d'identifier des différences entre les séquences et de définir des amorces plus spécifiques et ainsi améliorer la détection de *P. minutispora*. Cependant, l'impact de cette détection tardive est limité puisque dans les études environnementales menées en Autriche et en Australie, cette espèce n'a pas été isolée de l'environnement, et que dans notre étude, nous avons seulement retrouvé une colonie.

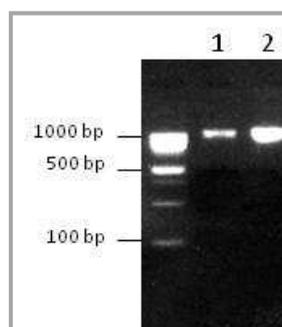
Disposant donc d'un outil fonctionnel, nous l'avons dans un second temps utilisé à partir d'échantillons de sol. L'extraction d'ADN à partir d'échantillons de terre apparaissant comme un facteur limitant dans des études comparables, nous avons travaillé sur du terreau stérile artificiellement contaminé par des spores de *Scedosporium* / *Pseudallescheria* pour optimiser les conditions d'extraction. A partir de ces échantillons contaminés artificiellement, notre méthode de détection par PCR quantitative s'est avérée sensible (limite de détection : 50 spores) et efficace (98%). Nous avons par ailleurs amélioré la sensibilité (5 spores) en utilisant une pré-amplification (nested-PCR), mais avec une perte d'efficacité (75%).

Malheureusement, nous n'avons pas obtenu de signal lors de l'utilisation de cette méthode sur des échantillons de terre positifs en culture pour le complexe *S. apiospermum* / *P. boydii*.

Nous avons testé notre méthode de PCR quantitative sur du terreau artificiellement contaminé par le complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. Notre choix de support de référence aurait dû s'orienter vers du sol, de la terre, qui contient certainement des inhibiteurs de PCR différents du terreau, en termes de qualité comme de quantité.

De plus, nous avons contaminé artificiellement le support avec des spores de *Pseudallescheria* / *Scedosporium* exclusivement. Or, nous avons montré dans notre étude de la distribution environnementale des espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum* que la flore microbienne est beaucoup plus complexe et importante que cela. Notre technique de PCR quantitative ne s'est pas révélée assez performante pour la détection du complexe à partir d'extraits d'ADN totaux du sol. En effet, la méthode d'extraction d'ADN du sol n'est pas spécifique du complexe. Un nombre trop important de micro-organismes est présent dans les échantillons de sol. Ainsi, notre test aurait pu consister en la contamination artificielle du support par des spores de plusieurs champignons filamenteux telluriques dont le complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. Nous pouvons aussi envisager de développer une méthode d'extraction d'ADN qui soit spécifique de ce complexe. Il faudrait pouvoir concentrer les éléments fongiques de ce complexe pour ensuite pouvoir les doser.

Nous avons aussi eu l'opportunité de tester un nouveau kit d'extraction d'ADN du sol, NucleoSpin® Soil, qui nous a fourni des résultats prometteurs. En effet, nous avons utilisé ce kit à partir d'échantillons de sol positifs en culture pour les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. Nous avons pu vérifier que l'extraction d'ADN génomique du sol était possible avec ce kit (Figure 26).



**Figure 26 : ADN génomiques extraits avec le kit NucleoSpin® Soil**  
Extraits réalisés à partir de deux échantillons positifs en culture pour les espèces du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*.

De même, nous avons pu amplifier l'ADN extrait en utilisant la PCR NS7-Scedo1 (Figure 27). Ceci signifie que l'ADN extrait avec ce kit est amplifiable. Cette PCR ayant été développée pour la détection spécifique des espèces de *Pseudallescheria / Scedosporium* (Wedde *et al.*, 1998), ces résultats sont encourageants. Toutefois, il sera nécessaire de vérifier la spécificité annoncée par les auteurs, comme nous avons pu le faire au cours de notre étude. L'idée serait alors de séquencer les bandes obtenues afin de sélectionner la portion la spécifique des espèces du complexe *P. boydii / S. apiospermum* et la moins commune aux autres espèces.

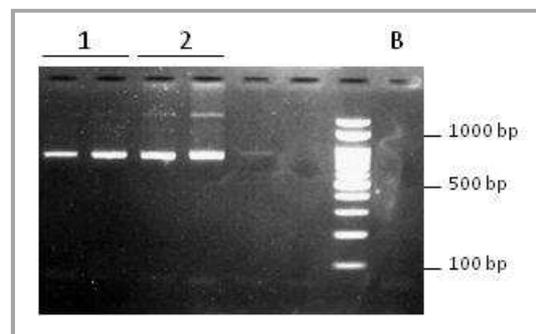


Figure 27 : Amplification par PCR à l'aide des amorces NS7 et Scedo1 de l'ADN extrait avec le kit NucleoSpin® Soil.

# **BIBLIOGRAPHIE**

**A**

- Aho R, Hirn J** (1981) A survey of fungi and some indicator bacteria in chlorinated water of indoor public swimming pools. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg B* **173**: 242–249
- Ajello L** (1952) The isolation of *Allescheria boydii* Shear, an etiologic agent of mycetomas, from soil. *Am J Trop Med Hyg* **1**: 227–238
- Ajello L** (1956) Soil as natural reservoir for human pathogenic fungi. *Science* **123**: 876–879
- Ajello L, Kuttin ES, Beemer AM, Kaplan W, Padhye A** (1977) Occurrence of *Histoplasma capsulatum* Darling, 1906 in Israel, with a review of the current status of histoplasmosis in the Middle East. *Am J Trop Med Hyg* **26**: 140–147
- Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, FILPOP Study Group** (2013) Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother* **57**: 3380–3387
- Alteras I, Evolceanu R** (1969) First isolation of *Allescheria boydii* from romanian soil. *Sabouraudia* **7**: 135–137
- Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F** (2010) The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. *Chest* **137**: 171–176
- April TM, Abbott SP, Foght JM, Currah RS** (1998) Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae). *Can J Microbiol* **44**: 270–278
- April TM, Foght JM, Currah RS** (1999) Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can J Microbiol* **46**: 38–49
- Araujo R, Pina-Vaz C, Rodrigues AG, Amorim A, Gusmão L** (2009) Simple and highly discriminatory microsatellite-based multiplex PCR for *Aspergillus fumigatus* strain typing. *Clin Microbiol Infect* **15**: 260–266

**B**

- Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nübling G** (2003) Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses* **46**: 19–23
- Bakerspigel A, Schaus D** (1984) Petriellidosis (pseudallescheriasis) in southwestern Ontario, Canada. *Sabouraudia* **22**: 247–249
- Barton RC, Borman AM, Johnson EM, Houbraken J, Hobson RP, Denton M, Conway SP, Brownlee KG, Peckham D, Lee TWR** (2010) Isolation of the fungus *Geosmithia argillacea* in sputum of people with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **48**: 2615–2617

- Bell RG** (1976) The development in beef cattle manure of *Petriellidium boydii* (Shear) Malloch, a potential pathogen for man and cattle. *Can J Microbiol* **22**: 552–556
- Bell RG** (1978) Comparative virulence and immunodiffusion analysis of *Petriellidium boydii* (Shear) Malloch strains isolated from feedlot manure and a human mycetoma. *Can J Microbiol* **24**: 856–863
- Bellis G, Cazes MH, Lemonnier L, Sponga M** (2013) Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données 2011.
- Bellis G, Fuhrman C, Le Roux E, Rault G, Ravilly S** (2007) Registre français de la mucoviscidose - Bilan des données 2005.
- Bernhardt A, Sedlacek L, Wagner S, Schwarz C, Würstl B, Tintelnot K** (2013) Multilocus sequence typing of *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros*. doi: 10.1016/j.jcf.2013.05.007
- Berthon JY, Grizard D** (2003) Inoculum fongique, procédés de préparation dudit inoculum et procédés de mise en oeuvre dans le traitement d'effluents riches en matière organique. EP1352953.
- Bertout S, Renaud F, Swinne D, Mallié M, Bastide JM** (1999) Genetic multilocus studies of different strains of *Cryptococcus neoformans*: taxonomy and genetic structure. *J Clin Microbiol* **37**: 715–720
- Bertrand S** (2009) Les sidérophores de *Scedosporium apiospermum*: identification, synthèse et applications. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, France.
- Bertrand S, Bouchara JP, Venier MC, Richomme P, Duval O, Larcher G** (2010) N( $\alpha$ )-methyl coprogen B, a potential marker of the airway colonization by *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S98–107
- Bertrand S, Larcher G, Landreau A, Richomme P, Duval O, Bouchara JP** (2009) Hydroxamate siderophores of *Scedosporium apiospermum*. *Biometals* **22**: 1019–1029
- Blyth CC, Harun A, Middleton PG, Sleiman S, Lee O, Sorrell TC, Meyer W, Chen SCA** (2010a) Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. *J Clin Microbiol* **48**: 314–316
- Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen SCA** (2010b) Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S37–44
- Borghi E, Iatta R, Manca A, Montagna MT, Morace G** (2010) Chronic airway colonization by *Scedosporium apiospermum* with a fatal outcome in a patient with cystic fibrosis. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S108–113
- Borman AM, Campbell CK, Linton CJ, Bridge PD, Johnson EM** (2006) *Polycytella hominis* is a mutated form of *Scedosporium apiospermum*. *Med Mycol* **44**: 33–39

- Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrère J, Favennec L, Ranque S, Gangneux JP, Horré R, Bouchara JP** (2010) Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S88–97
- Botstein D, White RL, Skolnick M, Davis RW** (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am J Hum Genet* **32**: 314–331
- Bouchara JP, Hsieh HY, Croquefer S, Barton R, Marchais V, Pihet M, Chang TC** (2009) Development of an oligonucleotide array for direct detection of fungi in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **47**: 142–152
- Boyle MP, De Boeck K** (2013) A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *The Lancet Respiratory Medicine* **1**: 158–163
- Brandsberg JW, Weeks RJ, Hill WB, Piggott WR** (1969) A study of fungi found in association with *Histoplasma capsulatum*: three bird roosts in S. E. Missouri, U.S.A. *Mycopathol Mycol Appl* **38**: 71–81
- Buzina W, Feierl G, Haas D, Reinthaler FF, Holl A, Kleinert R, Reichenpfader B, Roll P, Marth E** (2006) Lethal brain abscess due to the fungus *Scedosporium apiospermum* (teleomorph *Pseudallescheria boydii*) after a near-drowning incident: case report and review of the literature. *Med Mycol* **44**: 473–477
- C**
- Campbell CK** (1987) *Polycytella hominis* gen. et sp. nov., a cause of human pale grain mycetoma. *J Med Vet Mycol* **25**: 301–305
- Cano J, Rezusta A, Solé M, Gil J, Rubio MC, Revillo MJ, Guarro J** (2005) Inter-single-sequence-repeat-PCR typing as a new tool for identification of *Microsporum canis* strains. *J Dermatol Sci* **39**: 17–21
- Chabasse D, Bouchara JP, Chazallete JP, Carrère J, Giniès JL, de Gentile L, Cimon B** (1991) Mucoviscidose et colonisation fongique à *Scedosporium apiospermum*. A propos de trois observations. *J Mycol Méd* **1**: 152–155
- Chotirmall S, Branagan P, Gunaratnam C, McElvaney N** (2008) *Aspergillus*/allergic bronchopulmonary aspergillosis in an Irish cystic fibrosis population: a diagnostically challenging entity. *Respir Care* **53**: 1035–1041
- Cimon B, Carrère J, Chazallete JP, Giniès JL, Six P, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP** (1995) Fungal colonization and immune response to fungi in cystic fibrosis. *J Mycol Méd* **5**: 211–216
- Cimon B, Carrère J, Chazallete JP, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP** (1999) Chronic airway colonization by *Penicillium emersonii* in a patient with cystic fibrosis. *Med Mycol* **37**: 291–293

- Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP** (2000) Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **19**: 53–56
- Cimon B, Challier S, Béguin H, Carrère J, Chabasse D, Bouchara JP** (2005) Airway colonization by *Acrophialophora fusispora* in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **43**: 1484–1487
- Cimon B, Symoens F, Zouhair R, Chabasse D, Nolard N, Defontaine A, Bouchara JP** (2001) Molecular epidemiology of airway colonisation by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* **50**: 367–374
- Claußen M, Schmidt S** (1998) Biodegradation of phenol and p-cresol by the hyphomycete *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol* **149**: 399–406
- Claußen M, Schmidt S** (1999) Biodegradation of phenylbenzoate and some of its derivatives by *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol* **150**: 413–420
- Collins FS** (1992) Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* **256**: 774–779
- Cooke WB, Kabler P** (1955) Isolation of potentially pathogenic fungi from polluted water and sewage. *Public Health Rep* **70**: 689–694
- Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadiis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, et al.** (2008) Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev* **21**: 157–197
- Croxatto A, Prod'hom G, Greub G** (2012) Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* **36**: 380–407
- Cruse M, Telerant R, Gallagher T, Lee T, Taylor JW** (2002) Cryptic species in *Stachybotrys chartarum*. *Mycologia* **94**: 814–822

## D

- Dabrowa N, Landau JW, Newcomer VD, Plunkett OA** (1964) A survey of tide-washed coastal areas of southern California for fungi potentially pathogenic to man. *Mycopathol Mycol Appl* **24**: 136–150
- Davies WL, Vandenberg JI, Sayeed RA, Trezise AEO** (2004) Cardiac expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator involves novel exon 1 usage to produce a unique amino-terminal protein. *J Biol Chem* **279**: 15877–15887
- Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, Diouri M, Hallet JN, Bouchara JP** (2002) Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **40**: 2108–2114

**Delhaes L, Harun A, Chen SCA, Nguyen Q, Slavin M, Heath CH, Maszewska K, Halliday C, Robert V, Sorrell TC, et al.** (2008) Molecular typing of Australian *Scedosporium* isolates showing genetic variability and numerous *S. aurantiacum*. *Emerging Infect Dis* **14**: 282–290

**Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, Prevotat A, Wallet F, Wallaert B, Dei-Cas E, et al.** (2012) The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community - implications for therapeutic management. *PLoS ONE* **7**: e36313

**Doern GV, Brogden-Torres B** (1992) Optimum use of selective plated media in primary processing of respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **30**: 2740

**Döğen A, Kaplan E, Öksüz Z, Serin MS, Ilkit M, de Hoog GS** (2013) Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey. *Med Mycol* **51**: 493–498

**Downes FP, Ito K** (2001) Compendium of methods for the microbiological examination of foods, Fourth edition. American Public Health Association, Washington D.C.

**Drumm ML, Pope HA, Cliff WH, Rommens JM, Marvin SA, Tsui LC, Collins FS, Frizzell RA, Wilson JM** (1990) Correction of the cystic fibrosis defect *in vitro* by retrovirus-mediated gene transfer. *Cell* **62**: 1227–1233

## E

**El Allawy T, Atia M, Amer A** (1977) Mycoflora of the pharyngeal-tonsillar portion of clinically healthy donkeys [asses] in Assiut [Egypt]. *Assiut Vet Med J* **4**: 63–69

**Elad D** (2011) Infections caused by fungi of the *Scedosporium/Pseudallescheria* complex in veterinary species. *Vet J* **187**: 33–41

**van Ewijk BE, van der Zalm MM, Wolfs TFW, van der Ent CK** (2005) Viral respiratory infections in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **4 Suppl 2**: 31–36

## F

**Firacative C, Trilles L, Meyer W** (2012) MALDI-TOF MS enables the rapid identification of the major molecular types within the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex. *PLoS ONE* **7**: e37566

**Fisher JF, Shadomy S, Teabeaut JR, Woodward J, Michaels GE, Newman MA, White E, Cook P, Seagraves A, Yaghmai F, et al.** (1982) Near-drowning complicated by brain abscess due to *Petriellidium boydii*. *Arch Neurol* **39**: 511–513

**Frangolias DD, Mahenthalingam E, Rae S, Raboud JM, Davidson AGF, Wittmann R, Wilcox PG** (1999) *Burkholderia cepacia* in cystic fibrosis variable disease course. *Am J Respir Crit Care Med* **160**: 1572–1577

**G**

- Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J** (2005) Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol* **43**: 4930–4942
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J** (2009) Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med Mycol* **47**: 371–374
- Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J** (2008) Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol* **46**: 766–771
- Gilgado F, Gené J, Cano J, Guarro J** (2010) Heterothallism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleomorph *Pseudallescheria apiosperma* sp. nov. *Med Mycol* **48**: 122–128
- Gil-Lamaignere C, Roilides E, Hacker J, Müller FM** (2003) Molecular typing for fungi - a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect* **9**: 172–185
- Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, Carrère J, Degand N, Mely L, Favennec L, Dannaoui E, Bouchara JP, Calenda A** (2010) *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **48**: 2381–2386
- González-Escalada A, Del Palacio A, Calvo MT, Gené J, Guarro J** (2000) Two cases of scalp wound colonization and respiratory tract by mycelial fungi. *Rev Iberoam Micol* **17**: 149–151
- van Grunderbeeck N, Conseil V, Leroy S, Wallaert B, Delhaes L** (2010) The fungal risk in cystic fibrosis: a pilot study. *Ann Biol Clin* **68**: 157–162
- Guarro J, Kantarcioglu AS, Horr  R, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, de Hoog GS** (2006) *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol* **44**: 295–327
- Gu ho E, de Hoog GS** (1991) Taxonomy of the medical species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*. *J Med Mycol* **1**: 3–9
- Gugnani HC** (1972) Fungi isolated from lungs of small wild animals in India. *Mykosen* **15**: 479–482
- Gugnani HC, Okafor JI** (1980) Mycotic flora of the intestine and other internal organs of certain reptiles and amphibians with special reference to characterization of *Basidiobolus* isolates. *Mykosen* **23**: 260–268

**Guignard S, Hubert D, Dupont B, Anract P, Alioua D, Guerini H, Paugam A, Dougados M** (2008) Multifocal *Scedosporium apiospermum* spondylitis in a cystic fibrosis patient. *J Cyst Fibros* **7**: 89–91

## H

**Haase G, Skopnik H, Groten T, Kusenbach G, Posselt HG** (1991) Long-term fungal cultures from sputum of patients with cystic fibrosis. *Mycoses* **34**: 373–376

**Hamada N, Abe N** (2010) Comparison of fungi found in bathrooms and sinks. *Biocontrol Sci* **15**: 51–56

**Harun A, Blyth CC, Gilgado F, Middleton P, Chen SCA, Meyer W** (2011) Development and validation of a multiplex PCR for detection of *Scedosporium* spp. in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **49**: 1508–1512

**Harun A, Gilgado F, Chen SCA, Meyer W** (2010) Abundance of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways in cystic fibrosis. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S70–76

**Harun A, Perdomo H, Gilgado F, Chen SCA, Cano J, Guarro J, Meyer W** (2009) Genotyping of *Scedosporium* species: a review of molecular approaches. *Med Mycol* **47**: 406–414

**Healy M, Reece K, Walton D, Huang J, Shah K, Kontoyiannis DP** (2004) Identification to the species level and differentiation between strains of *Aspergillus* clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* **42**: 4016–4024

**Heath CH, Slavin MA, Sorrell TC, Handke R, Harun A, Phillips M, Nguyen Q, Delhaes L, Ellis D, Meyer W, et al.** (2009) Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clin Microbiol Infect* **15**: 689–693

**Hernández-Hernández F, Fréalle E, Caneiro P, Salleron J, Durand-Joly I, Accoceberry I, Bouchara JP, Wallaert B, Dei-Cas E, Delhaes L** (2012) Prospective multicenter study of *Pneumocystis jirovecii* colonization among cystic fibrosis patients in France. *J Clin Microbiol* **50**: 4107–4110

**Hickey PW, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Wickes BL, Schmidt HJ, Walsh TJ** (2009) *Trichosporon mycotoxinivorans*, a novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **47**: 3091–3097

**Hirschi S, Letscher-Bru V, Pottecher J, Lannes B, Jeung MY, Degot T, Santelmo N, Sabou AM, Herbrecht R, Kessler R** (2012) Disseminated *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Scedosporium apiospermum* coinfection after lung and liver transplantation in a cystic fibrosis patient. *J Clin Microbiol* **50**: 4168–4170

**Hocking AD, Pitt JI** (1980) Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low-moisture foods. *Appl Environ Microbiol* **39**: 488–492

- de Hoog GS, Marvin-Sikkema FD, Lahpoor GA, Gottschall JC, Prins RA, Guého E** (1994) Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses* **37**: 71–78
- Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Nidermajer S, Reiffert SM** (2009) Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients. *Respiration* **77**: 320–324
- Horré R, Schaal KP, Siekmeier R, Sterzik B, de Hoog GS, Schnitzler N** (2004) Isolation of fungi, especially *Exophiala dermatitidis*, in patients suffering from cystic fibrosis. A prospective study. *Respiration* **71**: 360–366
- Houbraken J, Giraud S, Meijer M, Bertout S, Frisvad JC, Meis JF, Bouchara JP, Samson RA** (2013) Taxonomy and antifungal susceptibility of clinically important *Rasamsonia* species. *J Clin Microbiol* **51**: 22–30
- Houbraken J, Spierenburg H, Frisvad JC** (2012) *Rasamsonia*, a new genus comprising thermotolerant and thermophilic *Talaromyces* and *Geosmithia* species. *Antonie Van Leeuwenhoek* **101**: 403–421
- I**
- Idris AH, Berg RA, Bierens J, Bossaert L, Branche CM, Gabrielli A, Graves SA, Handley AJ, Hoelle R, Morley PT, et al.** (2003) Recommended guidelines for uniform reporting of data from drowning: the “Utstein style.” *Circulation* **108**: 2565–2574
- Issakainen J, Jalava J, Eerola E, Campbell CK** (1997) Relatedness of *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and *Graphium pro parte* based on SSU rDNA sequences. *J Med Vet Mycol* **35**: 389–398
- J**
- Janda-Ulfig K, Ulfig K, Cano J, Guarro J** (2008) A study of the growth of *Pseudallescheria boydii* isolates from sewage sludge and clinical sources on tributyrin, rapeseed oil, biodiesel oil and diesel oil. *Ann Agric Environ Med* **15**: 45–49
- Jarvis B** (1973) Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in foods. *J Appl Bacteriol* **36**: 723–727
- Jimenez AL, Salvo NL** (2011) Mycetoma or synovial sarcoma? A case report with review of the literature. *J Foot Ankle Surg* **50**: 569–576
- K**
- Kälin N, Claass A, Sommer M, Puchelle E, Tümmler B** (1999) DeltaF508 CFTR protein expression in tissues from patients with cystic fibrosis. *J Clin Invest* **103**: 1379–1389

- Kaltseis J, Rainer J, de Hoog GS** (2009) Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol* **47**: 398–405
- Kantarcioglu AS, de Hoog GS, Guarro J** (2012) Clinical characteristics and epidemiology of pulmonary pseudallescheriasis. *Rev Iberoam Micol* **29**: 1–13
- Kaocharoen S, Ngamskulrungrroj P, Firacative C, Trilles L, Piyabongkarn D, Banlunara W, Poonwan N, Chaiprasert A, Meyer W, Chindamporn A** (2013) Molecular epidemiology reveals genetic diversity amongst isolates of the *Cryptococcus neoformans/C. gattii* species complex in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis* **7**: e2297
- Katragkou A, Dotis J, Kotsiou M, Tamiolaki M, Roilides E** (2007) *Scedosporium apiospermum* infection after near-drowning. *Mycoses* **50**: 412–421
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC** (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**: 1073–1080
- King AD, Hocking AD, Pitt JI** (1979) Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. *Appl Environ Microbiol* **37**: 959–964
- Kirk P** (1967) A comparison of saline tolerance and sporulation in marine and clinical isolates of *Allescheria boydii* Shear. *Mycopath Mycol Appl* **33**: 65–75
- Klaassen CH** (2009) MLST versus microsatellites for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol* **47**: S27–S33
- Kondori N, Gilljam M, Lindblad A, Jönsson B, Moore ERB, Wennerås C** (2011) High rate of *Exophiala dermatitidis* recovery in the airways of patients with cystic fibrosis is associated with pancreatic insufficiency. *J Clin Microbiol* **49**: 1004–1009
- Kreda SM, Davis CW, Rose MC** (2012) CFTR, mucins, and mucus obstruction in cystic fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2**: a009589
- Kristensen R, Torp M, Kosiak B, Holst-Jensen A** (2005) Phylogeny and toxigenic potential is correlated in *Fusarium* species as revealed by partial translation elongation factor 1 alpha gene sequences. *Mycol Res* **109**: 173–186
- Kunzelmann K** (2001) CFTR: interacting with everything? *News Physiol Sci* **16**: 167–170
- Kunzelmann K, Schreiber R** (1999) CFTR, a regulator of channels. *J Membr Biol* **168**: 1–8
- Kurup PV, Schmitt JA** (1970) Human-pathogenic fungi in the soils of central Ohio. *Ohio J Sci* **70**: 291–295
- Kuver R, Ramesh N, Lau S, Savard C, Lee SP, Osborne WR** (1994) Constitutive mucin secretion linked to CFTR expression. *Biochem Biophys Res Commun* **203**: 1457–1462

**L**

- Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, Meis JF** (2012) Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob Agents Chemother* **56**: 2635–2642
- Lackner M, Rezusta A, Villuendas MC, Palacian MP, Meis JF, Klaassen CH** (2011) Infection and colonisation due to *Scedosporium* in Northern Spain. An *in vitro* antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates. *Mycoses* **54 Suppl 3**: 12–21
- Lake FR, Tribe AE, McAleer R, Froudast J, Thompson PJ** (1990) Mixed allergic bronchopulmonary fungal disease due to *Pseudallescheria boydii* and *Aspergillus*. *Thorax* **45**: 489–491
- Lass-Flörl C, Rath P, Niederwieser D, Kofler G, Würzner R, Krezy A, Dierich MP** (2000) *Aspergillus terreus* infections in haematological malignancies: molecular epidemiology suggests association with in-hospital plants. *J Hosp Infect* **46**: 31–35
- Laugero C, Tillier D** (2008) Procédé de traitement biologique d'effluent d'élevage et le dispositif pour la mise en oeuvre de ce procédé. EP1242318.
- Lebecque P, Baran D** (2002) La mucoviscidose: La maladie, le traitement, les perspectives. Academia, Louvain-la-Neuve
- Lebecque P, Leonard A, Huang D, Reyhler G, Boeras A, Leal T, Symoens F** (2010) *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* and cystic fibrosis - Prevalence and risk factors. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S4–9
- Le Gal S, Héry-Arnaud G, Ramel S, Virmaux M, Damiani C, Totet A, Nevez G** (2010) *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis in France. *Scand J Infect Dis* **42**: 225–227
- Lennon PA, Cooper CR Jr, Salkin IF, Lee SB** (1994) Ribosomal DNA internal transcribed spacer analysis supports synonymy of *Scedosporium inflatum* and *Lomentospora prolificans*. *J Clin Microbiol* **32**: 2413–2416
- Lipuma JJ** (2010) The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* **23**: 299–323
- Llanos C, Kjøller A** (1976) Changes in the flora of soil fungi following oil waste application. *Oikos* **27**: 377
- López L, Gaztelurrutia L, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Barrón J, Hernández JL, Pérez R** (2001) Infection and colonization by *Scedosporium prolificans*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **19**: 308–313

**Lu Q, van den Ende AHGG, de Hoog GS, Li R, Accoceberry I, Durand-Joly I, Bouchara JP, Hernandez F, Delhaes L** (2011a) Reverse line blot hybridisation screening of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in patients with cystic fibrosis. *Mycoses* **54** Suppl 3: 5–11

**Lu Q, Gerrits van den Ende AHG, Bakkers JMJE, Sun J, Lackner M, Najafzadeh MJ, Melchers WJG, Li R, de Hoog GS** (2011b) Identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* Species by Three Molecular Methods. *J Clin Microbiol* **49**: 960–967

## **M**

**Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, et al.** (1998) Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 3140–3145

**Manso E, Cariani L, Fiscarelli E, Ravenni N, Iula VD, De Intinis G, Busetti M, Rapagnani S, Borio T** (2011) Isolation of filamentous fungi in the sputum of cystic fibrosis patients in Italy: state of the art and epidemiology. Second Meeting of the ECMM/ISHAM Working Group Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis. Angers, France.

**Marguet C, Favennec L, Matray O, Bertout S, Giraud S, Couderc L, Zouhair R, Leguillon C, Gargala G, Ballet JJ, et al.** (2012) Clinical and microbiological efficacy of micafungin on *Geosmithia argillacea* infection in a cystic fibrosis patient. *Medical Mycology Case Reports* **1**: 79–81

**Matos T, de Hoog GS, de Boer AG, de Crom I, Haase G** (2002) High prevalence of the neurotrope *Exophiala dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. *Mycoses* **45**: 373–377

**Mickle JE, Cutting GR** (2000) Genotype-phenotype relationships in cystic fibrosis. *Med Clin North Am* **84**: 597–607

**Milla CE, Wielinski CL, Regelman WE** (1996) Clinical significance of the recovery of *Aspergillus* species from the respiratory secretions of cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol* **21**: 6–10

**Miller MA, Greenberger PA, Amerian R, Toogood JH, Noskin GA, Roberts M, Patterson R** (1993) Allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Pseudallescheria boydii*. *Am Rev Respir Dis* **148**: 810–812

**Morin O, Haloun A, Treilhaud M, Sagan C, Boiron P** (1999) Mycose systémique à *Pseudallescheria boydii* chez une patiente greffée bipulmonaire pour une mucoviscidose: Etude des souches isolées en RAPD (Random Amplification Polymorphic DNA). *J Mycol Méd* **9**: 119–123

**Morio F, Horeau-Langlard D, Gay-Andrieu F, Talarmin JP, Haloun A, Treilhaud M, Despins P, Jossic F, Nourry L, Danner-Boucher I, et al.** (2010) Disseminated *Scedosporium / Pseudallescheria* infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **48**: 1978–1982

**Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, Skov M, Pressler T, Howard SJ, Leatherbarrow H, Mellado E, Arendrup MC** (2011) *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* **49**: 2243–2251

**Mulberg AE, Weyler RT, Altschuler SM, Hyde TM** (1998) Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator expression in human hypothalamus. *Neuroreport* **9**: 141–144

**Muthig M, Hebestreit A, Ziegler U, Seidler M, Müller FM** (2010) Persistence of *Candida* species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Med Mycol* **48**: 56–63

## N

**Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, Walker JM, Goldsmith CE, Rendall J, Moore JE** (2010) Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* **48**: 166–176.e1

**Nakamura Y** (2001) Molecular analyses of the serotype of *Cryptococcus neoformans*. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi* **42**: 69–74

**Neal CO, Richardson AO, Hurst SF, Tortorano AM, Viviani MA, Stevens DA, Balajee SA** (2011) Global population structure of *Aspergillus terreus* inferred by ISSR typing reveals geographical subclustering. *BMC Microbiol* **11**: 203

**Nesky MA, McDougal EC, Peacock Jr JE** (2000) *Pseudallescheria boydii* brain abscess successfully treated with voriconazole and surgical drainage: case report and literature review of central nervous system pseudallescheriasis. *Clin Infect Dis* **31**: 673–677

**Neuvéglise C, Sarfati J, Debeauvais JP, Vu Thien H, Just J, Tournier G, Latgé JP** (1997) Longitudinal study of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **16**: 747–750

**Nishimura K, Miyaji M** (1982) Studies on a saprophyte of *Exophiala dermatitidis* isolated from a humidifier. *Mycopathologia* **77**: 173–181

**Nomoto T** (2003) Promoter for composting. JP3485345.

## O

**Ødegaard I, Stray-Pedersen B, Hallberg K, Haanaes OC, Storrøsten OT, Johannesson M** (2002) Prevalence and outcome of pregnancies in Norwegian and Swedish women with cystic fibrosis. *Acta Obstet Gynecol Scand* **81**: 693–697

**P**

- Packeu A, Lebecque P, Rodriguez-Villalobos H, Boeras A, Hendrickx M, Bouchara JP, Symoens F** (2012) Molecular typing and antifungal susceptibility of *Exophiala* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* **61**: 1226–1233
- Paugam A, Baixench MT, Demazes-Dufeu N, Burgel PR, Sauter E, Kanaan R, Dusser D, Dupouy-Camet J, Hubert D** (2010) Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S32–36
- Pawar V, Padhye A, Thirumalachaer M** (1963) Isolation of *Monosporium apiospermum* from marine soil in Bombay. *Hindust Antibiot Bull* **6**: 50–53
- Pederiva MA, Wissmann G, Friaiza V, Morilla R, de La Horra C, Montes-Cano MA, Goldani LZ, Calderón EJ, Prolla JC** (2012) High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Med Mycol* **50**: 556–560
- Pham T, Giraud S, Rougeron A, Pihet M, Calenda A, Bouchara JP** (2010) Scedo-Select III: a new semi-selective culture medium for environmental studies. Third meeting of the ECMM/ISHAM Working group on *Pseudallescheria/Scedosporium* infections. Bonn, Allemagne.
- Pihet M, Carrère J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, Bouchara JP** (2009) Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis - a review. *Med Mycol* **47**: 387–397
- Pincus DH, Coleman DC, Pruitt WR, Padhye AA, Salkin IF, Geimer M, Bassel A, Sullivan DJ, Clarke M, Hearn V** (1999) Rapid identification of *Candida dubliniensis* with commercial yeast identification systems. *J Clin Microbiol* **37**: 3533–3539

**R**

- Rainer J, de Hoog GS** (2006) Molecular taxonomy and ecology of *Pseudallescheria*, *Petriella* and *Scedosporium prolificans* (Microasceae) containing opportunistic agents on humans. *Mycol Res* **110**: 151–160
- Rainer J, de Hoog GS, Wedde M, Gräser Y, Gilges S** (2000) Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. *J Clin Microbiol* **38**: 3267–3273
- Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, Summerbell RC** (2008) Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**: 315–322
- Rainer J, Mayr A, Lass-Flörl C, Dierich MP** (2007) Abundance of *Pseudallescheria boydii* in CF-patients, detected with a semi-selective isolation method. Second meeting of the ECMM/ISHAM Working group on *Pseudallescheria/Scedosporium* infections. Angers, France.

- Ramirez R, Robertstad GW, Hutchinson LR, Chavez J** (1976) Mycotic flora in the lower digestive tract of feral pigeons (*Columba livia*) in the El Paso, Texas area. *J Wildl Dis* **12**: 83–85
- de Ravin SS, Challipalli M, Anderson V, Shea YR, Marciano B, Hilligoss D, Marquesen M, Decastro R, Liu Y-C, Sutton DA, et al.** (2011) *Geosmithia argillacea*: an emerging cause of invasive mycosis in human chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* **52**: e136–143
- Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, de la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, Calderon E, Varela JM** (2005) Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect* **11**: 1012–1015
- Rich DP, Anderson MP, Gregory RJ, Cheng SH, Paul S, Jefferson DM, McCann JD, Klinger KW, Smith AE, Welsh MJ** (1990) Expression of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator corrects defective chloride channel regulation in cystic fibrosis airway epithelial cells. *Nature* **347**: 358–363
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL** (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**: 1066–1073
- Rippon JW** (1988) *Medical mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes*, 3rd ed. WB Saunders, Philadelphia
- Rippon JW, Carmichael JW** (1976) Petriellidiosis (allescheriosis): four unusual cases and review of literature. *Mycopathologia* **58**: 117–124
- Robert R, Thoreau V, Norez C, Cantereau A, Kitzis A, Mettey Y, Rogier C, Becq F** (2004) Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel by beta-adrenergic agonists and vasoactive intestinal peptide in rat smooth muscle cells and its role in vasorelaxation. *J Biol Chem* **279**: 21160–21168
- Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Guarro J, Kantarcioglu AS, Horre R, de Hoog GS, Cuenca-Estrella M** (2009) Epidemiology and outcome of *Scedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases. *Med Mycol* **47**: 359–370
- Rogers C, Stoltz D, Meyerholz D, Ostedgaard L, Rokhlina T, Taft P, Rogan M, Pezzulo A, Karp P, Itani O, et al.** (2008) Disruption of the CFTR gene produces a model of cystic fibrosis in newborn pigs. *Science* **321**: 1837–1841
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N** (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**: 1059–1065
- Rougeron A, Giraud S, Razafimandimby B, Meis JF, Bouchara JP, Klaassen CHW** (2013) Different colonization patterns of *Aspergillus terreus* in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect*. doi: 10.1111/1469-0691.12323

**Rudramurthy SM, de Valk HA, Chakrabarti A, Meis JFGM, Klaassen CHW** (2011) High resolution genotyping of clinical *Aspergillus flavus* isolates from India using microsatellites. *PLoS One* **6**: e16086

## S

**Schønheyder H, Jensen T, Laessøe IH, Højby N, Koch C** (1988) Serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* catalase in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **7**: 40–44

**Severo LC, Oliveira F de M, Irion K** (2004) Respiratory tract intracavitary colonization due to *Scedosporium apiospermum*: report of four cases. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **46**: 43–46

**Shin JH, Ranken R, Sefers SE, Lovari R, Quinn CD, Meng S, Carolan HE, Toleno D, Li H, Lee JN, et al.** (2013) Detection, identification, and distribution of fungi in bronchoalveolar lavage specimens by use of multilocus PCR coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. *J Clin Microbiol* **51**: 136–141

**Sidot C** (2006) *Scedosporium apiospermum* et mucoviscidose: étude environnementale au domicile des patients. Thèse de Doctorat en Pharmacie. Université d'Angers, Angers, France.

**Sidot C, Simon P, Bouchara JP, Chabasse D, Urban T, Giniès JL** (2007) *Scedosporium apiospermum*. Environmental study in the homes of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **6 Suppl 1**: S29

**Simner PJ, Uhl JR, Hall L, Weber MM, Walchak RC, Buckwalter S, Wengenack NL** (2013) Broad-range direct detection and identification of fungi by use of the PLEX-ID PCR-electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) system. *J Clin Microbiol* **51**: 1699–1706

**Sing A, Geiger AM, Hogardt M, Heesemann J** (2001) *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. *J Clin Microbiol* **39**: 2717–2718

**Sotgiu G, Mazzoni A, Mantovani A, Ajello L, Palmer J** (1966) Survey of soils for human pathogenic fungi from the Emilia-Romagna region of Italy. II. Isolation of *Allescheria boydii*, *Cryptococcus neoformans* and *Histoplasma capsulatum*. *Am J Epidemiol* **83**: 329–337

**Speirs JJ, van der Ent CK, Beekman JM** (2012) Effects of *Aspergillus fumigatus* colonization on lung function in cystic fibrosis. *Curr Opin Pulm Med* **18**: 632–638

**Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, Denning DW, Cramer R, Brody AS, Light M, et al.** (2003) Allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis - state of the art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin Infect Dis* **37 Suppl 3**: S225–264

**Summerbell RC** (1993) The benomyl test as a fundamental diagnostic method for medical mycology. *J Clin Microbiol* **31**: 572

**Summerbell RC, Krajden S, Kane J** (1989) Potted plants in hospitals as reservoirs of pathogenic fungi. *Mycopathologia* **106**: 13–22

**Symoens F, Bouchara JP, Heinemann S, Nolard N** (2000) Molecular typing of *Aspergillus terreus* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *J Hosp Infect* **44**: 273–280

**Symoens F, Haase G, Pihet M, Carrere J, Beguin H, Degand N, Mely L, Bouchara JP** (2010) Unusual *Aspergillus* species in patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* **48**: S10–S16

**Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, Denis O, Estenne M, Nolard N, Jacobs F** (2006) Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* **25**: 603–607

## I

**Taylor JW, Fisher MC** (2003) Fungal multilocus sequence typing - it's not just for bacteria. *Curr Opin Microbiol* **6**: 351–356

**Tintelnot K, Just-Nübling G, Horré R, Graf B, Sobottka I, Seibold M, Haas A, Kaben U, de Hoog GS** (2009) A review of German *Scedosporium prolificans* cases from 1993 to 2007. *Med Mycol* **47**: 351–358

## V

**Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, Abele-Horn M** (2008) Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **7**: 123–127

**de Valk HA, Klaassen CHW, Meis JFGM** (2008) Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses* **51**: 463–476

**de Valk HA, Klaassen CHW, Yntema JB, Hebestreit A, Seidler M, Haase G, Müller FM, Meis JFGM** (2009) Molecular typing and colonization patterns of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* **8**: 110–114

**Vanhee LME, Symoens F, Bouchara JP, Nelis HJ, Coenye T** (2008) High-resolution genotyping of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from chronically colonised patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **27**: 1005–1007

**Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ** (2002) The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* **1**: 13–29

- Verweij PE, Meis JF, Sarfati J, Hoogkamp-Korstanje JA, Latgé JP, Melchers WJ** (1996) Genotypic characterization of sequential *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **34**: 2595–2597
- Vissiennon T** (1999) Fungal flora in chicken stalls and its etiopathogenic importance for humans and animals. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr* **112**: 104–107
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M** (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* **23**: 4407–4414
- de Vrankrijker AMM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJL, Bonten MJM, Wolfs TFW** (2011) *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clin Microbiol Infect* **17**: 1381–1386

## W

- Wedde M, Müller D, Tintelnot K, de Hoog GS, Stahl U** (1998) PCR-based identification of clinically relevant *Pseudallescheria/Scedosporium* strains. *Med Mycol* **36**: 61–67
- Welham KJ, Domin MA, Johnson K, Jones L, Ashton DS** (2000) Characterization of fungal spores by laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom* **14**: 307–310
- Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV** (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* **18**: 6531–6535
- Williamson EC, Speers D, Arthur IH, Harnett G, Ryan G, Inglis TJ** (2001) Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. *J Clin Microbiol* **39**: 47–50
- Witt H** (2003) Chronic pancreatitis and cystic fibrosis. *Gut* **52 Suppl 2**: ii31–41
- Wojnarowski C, Eichler I, Gartner C, Götz M, Renner S, Koller DY, Frischer T** (1997) Sensitization to *Aspergillus fumigatus* and lung function in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* **155**: 1902–1907
- Wolk DM, Kaleta EJ, Wysocki VH** (2012) PCR-electrospray ionization mass spectrometry: the potential to change infectious disease diagnostics in clinical and public health laboratories. *J Mol Diagn* **14**: 295–304

## Y

- Yoshimura K, Nakamura H, Trapnell BC, Chu CS, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG** (1991) Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene in cells of non-epithelial origin. *Nucleic Acids Res* **19**: 5417–5423

**Z**

- Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N** (2011) Dishwashers - a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biol* **115**: 997–1007
- Zouhair R, Defontaine A, Ollivier C, Cimon B, Symoens F, Halle JN, Deunff J, Bouchara JP** (2001) Typing of *Scedosporium apiospermum* by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA. *J Med Microbiol* **50**: 925–932
- Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S** (2013) Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* **51**: 603–13

# ANNEXES

## Different colonization patterns of *Aspergillus terreus* in patients with cystic fibrosis

A. Rougeron<sup>1,2</sup>, S. Giraud<sup>1</sup>, B. Razafimandimby<sup>1</sup>, J. F. Meis<sup>3,4</sup>, J.-P. Bouchara<sup>1,2</sup> and C. H. W. Klaassen<sup>4</sup>

1) LUNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, 2) Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France, 3) Radboud University Nijmegen Medical Centre and 4) Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Canisius Wilhelmina Hospital, Nijmegen, the Netherlands

### Abstract

*Aspergillus terreus* is a common soil saprophyte. After *Aspergillus fumigatus* and *Scedosporium apiospermum* it ranks third amongst the filamentous fungi colonizing the airways of patients with cystic fibrosis. In this context, the clinical presentation of *A. terreus* infection mainly corresponds to allergic broncho-pulmonary aspergillosis. In the work presented here, we studied colonization patterns of *A. terreus* in CF patients by genotyping using nine short tandem repeat markers. A total of 115 clinical isolates from respiratory secretions collected from five French CF patients were studied. The number of isolates varied from 15 to 39 per patient, and the duration of the follow-up period ranged from 2 months to 7.5 years. Seventeen genotypes were identified, corresponding to three distinct colonization patterns. The first colonization pattern consisted of a chronic colonization by one dominant genotype associated with few other genotypes found only incidentally. The second colonization pattern consisted of a prolonged colonization by two distinct genotypes detected simultaneously. The last pattern was characterized by multiple different genotypes that were present only transiently. These results demonstrate the importance of genotyping clinical isolates before making conclusions about chronic colonization of the airways in CF patients in the case of repeated isolation of the fungus.

**Keywords:** *Aspergillus terreus*, colonization pattern, cystic fibrosis, microsatellite typing

**Original Submission:** 4 March 2013; **Revised Submission:** 31 May 2013; **Accepted:** 29 June 2013

Editor: E. Røilides

*Clin Microbiol Infect*

**Corresponding author:** C. H. W. Klaassen, Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, C70, Canisius Wilhelmina Hospital, Weg door Jonkerbos 100, 6532 SZ Nijmegen, the Netherlands  
E-mail: c.klaassen@cwz.nl

### Introduction

Patients with cystic fibrosis (CF) are at high risk of colonization of the airways by various microorganisms. This may lead to true infections, which are the major cause of morbidity and mortality in these patients [1]. Bacteria, particularly *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, cause acute pulmonary exacerbations. Nevertheless, fungal colonization of the airways, which is rarely found in young

children, is increasingly gaining attention. Bronchoalveolar epithelial lesions resulting from bacterial infections seem to be required for the establishment of fungi in the respiratory tract of CF patients [2]. *Aspergillus fumigatus* is by far the most common filamentous fungus colonizing the airways of CF patients [3], but the fungal biota is obviously much more complex. The *Scedosporium apiospermum* species complex and *Exophiala dermatitidis* are among the most clinically relevant other fungi recovered from respiratory secretions of CF patients [4,5] but other *Aspergillus* species may also be encountered in this context. Whereas *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Aspergillus nidulans* were usually found transiently, *Aspergillus terreus* is also reported as a chronic colonizer of the airways of CF patients. This fungus, the prevalence of which ranges from 1.9 to 6.2%, ranks third among the filamentous fungi colonizing the airways of CF patients [6,7]. Clinical signs and symptoms associated with

*A. terreus* colonization are mainly associated with allergic broncho-pulmonary aspergillosis.

*Aspergillus terreus* is a common soil saprophyte, previously described in desert soils and grasslands as well as a contaminant of stored corn. Its relative paucity in the environment compared with other fungi such as *A. fumigatus* contrasts with its relatively high occurrence in the CF context. Little is known about the epidemiology of this fungus. Several genotyping methods have been used before, including random amplified polymorphic DNA (RAPD) [7–10], repetitive-sequence-based PCR (rep-PCR) [11] and Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) PCR [12], which demonstrated extensive genotype diversity in *A. terreus* species. However, these techniques, based on complex banding pattern analysis, often have poor inter-laboratory reproducibility and do not allow exchange of results between laboratories [13]. Balajee [14] applied limited multi-locus sequencing typing (MLST) based on three genes to study *A. terreus* diversity and defined a new genotypically distinct species, *Aspergillus alabamensis*. Disadvantages of this sequencing approach are its moderate ease of use, its limited discriminatory power and its higher cost. Microsatellite-based typing, also referred to as short tandem repeat (STR)-based typing, involves analysis of the number of tandem repetitions of short repetitive sequences at specific loci yielding a numerical and exact typing result. Such assays are already well-established for other *Aspergillus* species such as *A. fumigatus* and *A. flavus* [15–17] and offer multiple advantages such as a high discriminatory power, high reproducibility and easy exchange of results. Whereas genus-wide microsatellite markers seem to contain only limited allelic variation [18], species-specific microsatellite markers often show extensive allelic variation and offer high discriminatory power. Here, we report for the first time on the use of a microsatellite-based typing method designed for *A. terreus* to investigate its molecular epidemiology by studying colonization patterns of this fungus in CF patients.

## Materials and methods

### Isolates and culture conditions

One hundred and fifteen clinical isolates of *A. terreus* were recovered from 45 respiratory secretions (sputum or bronchial aspiration samples) collected from five CF patients followed-up in hospitals in Angers (patients A, B, C and E) and Giens (patient D). All *A. terreus* isolates recovered from the samples were preserved by freeze-drying in our culture collection after confirmation of the identification. The number of available isolates for genotyping varied from 15 to 39 per patient, and the duration of the follow-up ranged from

2 months to 7.5 years (Table S1). Twenty-five additional clinical samples from the same patients were collected for mycological analysis. Eight of them were culture-negative for *A. terreus*. Four out of these eight samples were culture-positive for *A. fumigatus*. Consequently, due to its more rapid and more extensive growth, we cannot rule out that *A. fumigatus* may have masked the presence of more slowly growing fungi such as *A. terreus*. For the other samples, *A. terreus* isolates were not available for microsatellite analysis, mainly because of the simultaneous presence of *A. fumigatus*, which impeded isolation of pure *A. terreus* colonies.

Isolates were maintained on yeast extract-peptone-dextrose agar (YPDA) plates supplemented with 0.5% chloramphenicol. Cultures were incubated at 37°C. Identification was established by cultural features according to standard description and microscopic investigation after mounting in lactic blue stain. For DNA extraction, isolates were grown in yeast extract-peptone-dextrose (YPD) broth.

### Genomic DNA extraction

Mycelium was harvested from 7-day-old cultures in YPD broth (10 mL) and ground in liquid nitrogen with a mortar and pestle. DNA was recovered using the DNeasy plant mini kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) protocol with minor modifications as described previously [19]. The DNA concentration was estimated using a Nano-Drop spectrophotometer (NanoDrop Technologies Inc., Wilmington, DE, USA) at 260 nm.

### Microsatellite typing

Nine short tandem repeat (STR) markers were selected from the available genomic sequence of *A. terreus* NIH 2624 using selection criteria previously reported for *A. fumigatus* [16]. Three multiplex PCRs, identified as M2, M3 and M4, were performed amplifying three di-, tri- or tetranucleotide repeat markers, respectively. For each marker, one of the primers was labelled at the 5' end with either carboxyfluorescein (FAM), hexachlorofluorescein (HEX) or tetramethylrhodamine (TAMRA). Primer concentrations were optimized (Table 1) and PCR conditions were carried out using reaction conditions as described previously [16]. The amplification programme consisted of 10 min of denaturation at 95°C, followed by 30 cycles of 30 s of denaturation at 95°C, 30 s of annealing at 60°C, and 1 min of extension at 72°C. After an additional incubation for 10 min at 72°C, reaction mixtures were cooled to room temperature. PCR products were diluted 30-fold with distilled water. One microlitre of diluted products was combined with 0.25 µL of ET-ROX 400 marker (GE Healthcare, Diegem, Belgium). Amplicons were then separated by size and detected on a MegaBACE 500 automated DNA analysis platform equipped with a 48-capillary

**TABLE 1.** Basic features of the selected microsatellite markers and primers used

Multiplex panel	Marker	Primer sequences	Repeat unit	Allelic range <sup>a</sup>	Primer concentration (μM)
M2	STRAt-2A	FAM- TGGTACTGCTCCGAGTTTCC GACGAGACGAAGACCAAGG	GT	4-34	0.2 0.2
	STRAt-2B <sup>b</sup>	HEX- CGCAAGACCATCCGAAGTAT GCTGGATAGGCGATGGAG GCTGGATAGGCGAGGG	TC	6-43	0.1 0.1 0.1
	STRAt-2C	TAMRA- GCGGTGAGGAGAAGAAGATG GGCTTCCCTCTGTGTACTG	TC	7-40	   
M3	STRAt-3A	FAM- CCTGTATCGTCGGAAAGAA GATCGCTGGAGGATGGTA	AGT	3-21	   
	STRAt-3B	HEX- TTTCTTCTGGCCTCCTCTA GCGGAGCGACTCTCTAGTGA	ATG	3-24	0.1 0.1
	STRAt-3C	TAMRA- TCGGCGACGTAGCAAATTAC GAGTAGGGAATACCCGCACA	GTA	5-67	   
M4	STRAt-4A	FAM- GATGCAGGTGGACATAAGCA GGGGTAAGTTGCGTTCCATA	ACAT	3-11	0.1 0.1
	STRAt-4B	HEX- TGGCTGGAAATAGGGGTACA GCATGCATTGCGGCTATTTA	TTTC	3-42	0.5 0.5
	STRAt-4C	TAMRA- ATCCTAGTGCATGGGTCCAG GAACGCGAGAGATGGAAGA	TCTT	3-15	 

<sup>a</sup>The allelic range for each marker was determined using a larger panel of ~400 *A. terreus* isolates (CHW Klaassen et al., unpublished observations).

<sup>b</sup>Due to sequence variations in the binding site of the unlabelled primer for this marker, initially a significant fraction of isolates did not yield an amplification product. Therefore a third amplification primer was included for this marker to cover this variation.

array (GE Healthcare), as recommended by the manufacturer. Repeat numbers in each marker were assigned using Genetic Profiler v2.2 (GE Healthcare) using *A. terreus* NIH 2624 as a reference. The genotype of NIH 2624 is 19-19-24-15-21-18-9-9-8 for markers 2A-2B-2C-3A-3B-3C-4A-4B-4C, respectively. Genotyping data were imported and analysed using BioNumerics v6.0 (Applied Math, St Martens-Latum, Belgium).

#### Definitions

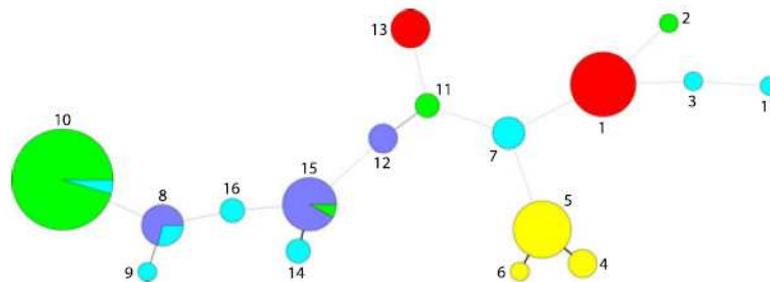
Isolates were considered to be (i) identical when all nine markers yielded corresponding repeat numbers, (ii) genetically closely related when their genotypes differed in only one marker and (iii) unrelated if their genotypes differed in more than one marker. A patient was considered to be chronically colonized when identical or closely related genotypes were recovered from at least three distinct clinical samples collected over a period of more than 6 months. For a shorter period (ranging from 2 to 6 months) the term 'prolonged colonization' was used.

## Results

A total of 115 isolates collected from five CF patients were analysed using the nine microsatellite marker panel. Seventeen distinct genotypes were identified (Table S2 and Fig. 1). Among them, five genotypes (2, 3, 6, 9 and 17) were found only once, and three genotypes (8, 10 and 15) were shared between isolates collected from distinct patients (patients C and E, patients A and E and patients A and C, respectively). In addition, two small clusters were observed of closely related genotypes that differed from each other in a single marker.

Isolates contained in these clusters were recovered from clinical specimens collected from the same patient (cluster of genotypes 4, 5 and 6) or not (cluster of genotypes 14 and 15).

The five patients showed three different colonization patterns. First, a chronic colonization by largely one dominant genotype was observed in patients A and B (Fig. 2). Regarding patient A, 35 out of the 39 isolates of *A. terreus* studied were of the same genotype (Fig. 2a). These isolates were recovered over a 2-year period (from March 2004 to March 2006) and a 6-month period (from June to December 2006). Between these two periods, two other sputum samples were culture-positive for *A. terreus* on 21 March 2006 and 13 April 2006, but corresponding isolates were not available for microsatellite analysis. Therefore, one may speculate for this patient that there was a chronic colonization of the airways by a specific genotype over a 3-year period. Three other genotypes were found only once (genotypes 2 and 15) or twice (genotype 11) over the study period. For patient B, 27 sputum samples were collected over a period of 7.5 years. Of them, 22 were culture-positive for *A. terreus* and 24 isolates were available for genotyping study (Fig. 2b). Only two different genotypes were identified (genotypes 1 and 13). While recurrent isolation occurred over a 7.5-year period for genotype 1 and a 22-month period for genotype 13 (from January 2008 to October 2009), only one episode of chronic colonization of the airways was clearly demonstrated for genotype 1 from November 2006 to January 2007. However, seven other sputum samples were also culture-positive for *A. terreus*, but these isolates were not available for microsatellite analysis. In addition, three of the five *A. terreus* culture-negative samples grew *A. fumigatus*, which could have masked the presence of *A. terreus* in primary plates. The possibility of a longer duration of chronic colonization by



**FIG. 1.** Minimal spanning tree representing the observed genotypic diversity. Each colour represents a different patient. Patient A, green; patient B, red; patient C, blue; patient D, yellow; patient E, cyan. Each circle corresponds to a unique genotype. The size of each circle corresponds to the number of isolates with the same genotype. Connecting lines correspond to the number of different markers between the genotypes: short thick line, 1 marker difference (out of nine); regular line, 2 markers difference; dashed line, 3 markers difference; dotted line, 4 or more markers difference. For instance, in patient D (yellow) three different genotypes were observed that differed in only 1 marker. Numbers correspond to genotype numbers mentioned in the text.

genotype 1, from May 2005 to November 2008, followed by a chronic colonization with genotype 13 from January 2008 to October 2009, therefore cannot be ruled out.

The second colonization pattern consisted of a prolonged colonization by distinct (patient C) or closely related (patient D) genotypes (Fig. 3). The 19 isolates recovered from 12 sputum samples collected from patient C belonged to three different genotypes (Fig. 3a). Genotype 12 was found only once while genotypes 8 and 15 were isolated three times over a 4-month period and five times over a 3-month period, respectively. Co-colonization by these two genotypes was observed in April and May 2005. As some isolates were not available for microsatellite analysis, genotype 15 and/or genotype 8 may have been responsible for a chronic colonization over a longer period. Regarding patient D, three closely related genotypes that differed in only one marker as a possible result of micro-evolutionary changes were identified over the 2-month collection period among the 18 isolates recovered from four sputum samples (Fig. 3b). Genotypes 4 and 5 were recovered from four and three sputum samples, respectively, thus suggesting for patient D a prolonged colonization of the airways by these two related genotypes.

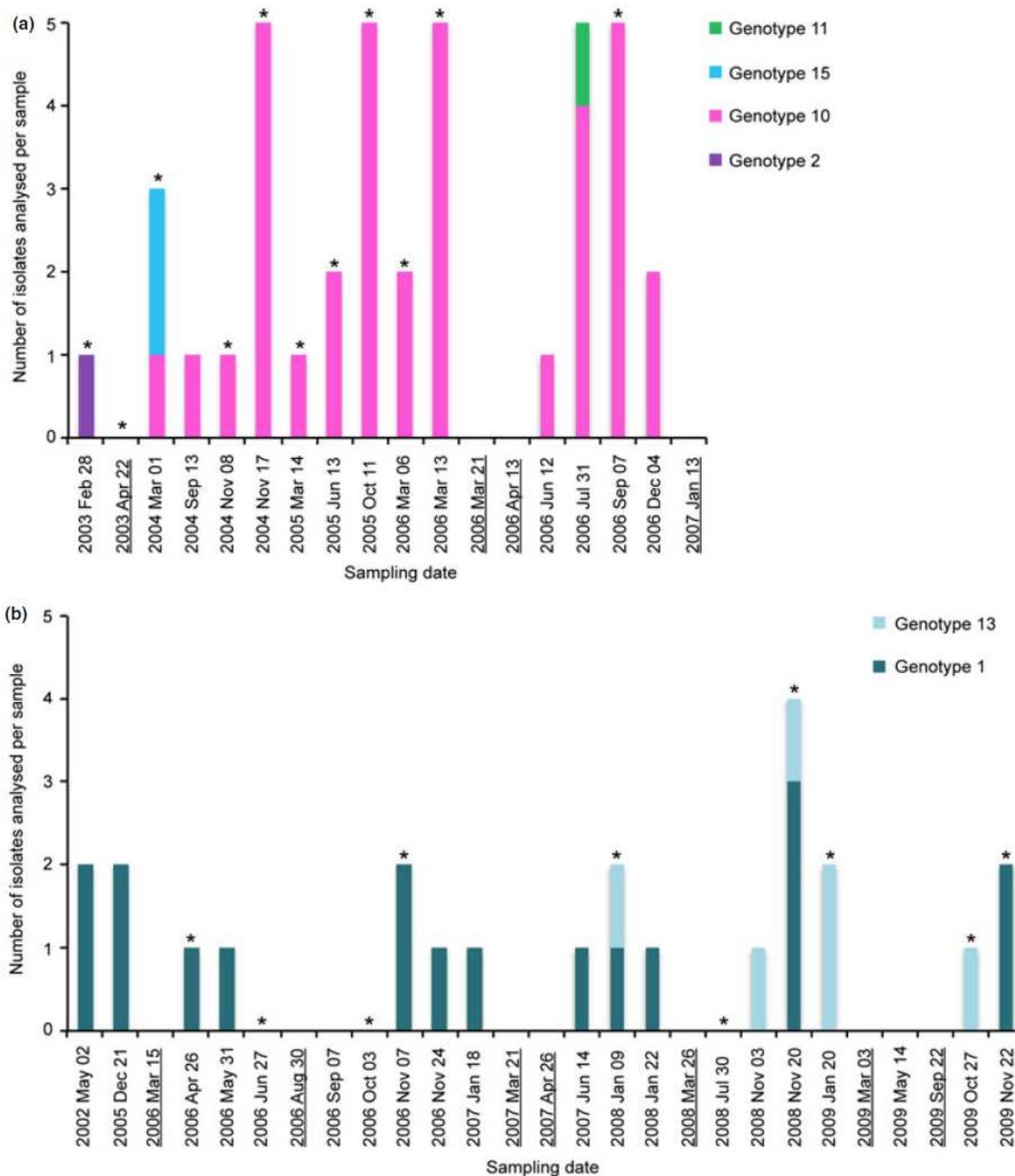
Finally, patient E demonstrated a totally different pattern of colonization with *A. terreus* because none of the genotypes identified for this patient seemed to be involved in a chronic or prolonged colonization as defined in the Materials and Methods section (Fig. 4). Eight genetically distinct genotypes were identified among the 15 isolates obtained from five sputum samples over a 4-year collection period. Only genotypes 7 and 14 were found twice, but separated in time by a culture-negative sample. *Aspergillus fumigatus* was found in only one of the three *A. terreus* culture samples. These results suggest carriage of various genotypes found transiently in the

respiratory secretions and not a real chronic colonization of the airways.

## Discussion

A panel of nine short tandem repeat markers was used to study the epidemiology of *A. terreus* in cystic fibrosis patients. The STR analysis divided our 115 isolates recovered from 45 sputum samples into 17 genotypes. In agreement with previous studies [9,20], the isolates from the different patients showed a considerable genetic diversity. Nevertheless, two clusters of isolates with almost identical genotypes were observed, suggesting clonal expansion and/or micro-evolutionary events. Micro-evolution has already been suggested for *A. fumigatus* isolates in the CF context [21] and also for *A. flavus* in Indian clinical isolates [22].

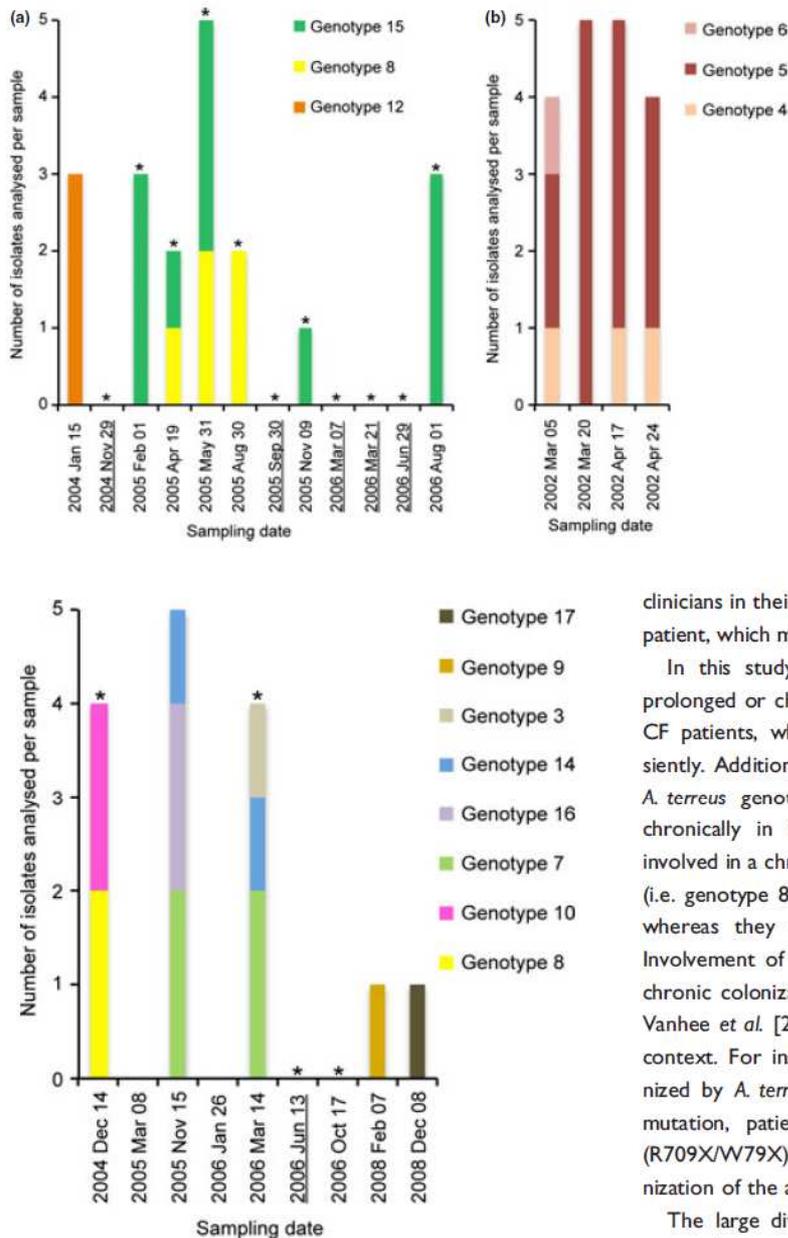
Whereas previous studies in the CF context described colonization of the respiratory tract of the patients by a single genotype of *A. terreus* [7,10], we reported here three distinct colonization patterns: (i) a chronic colonization by a predominant genotype, (ii) a prolonged colonization by two genetically distinct or closely related genotypes and (iii) transient carriage of different genotypes. The discrepancy with regard to previous studies may be due to the limited number of isolates analysed in previous studies and/or lack of sufficient discriminatory power of previously used methods. Our results highlight the need to collect multiple isolates per sample and use highly discriminatory typing methods during mycological analysis for a better knowledge of the epidemiology. Isolates included in this retrospective study were recovered from 45 sputum samples and two or three genotypes were found simultaneously from 20% to 7% of these samples, respectively.



**FIG. 2.** Chronic colonization by a largely dominant genotype observed in patient A (a) and patient B (b). Genotypes are represented by distinct colours. Underlined samples were culture-positive for *Aspergillus terreus*, but the isolates were not available for microsatellite analysis. An asterisk indicates a sample positive for *Aspergillus fumigatus*.

This phenomenon was previously described in CF patients colonized by *A. fumigatus* [23], and in a few patients with an invasive aspergillosis due to *A. terreus* [9]. Moreover, this study points out that multiple and sequential isolates from respiratory

secretions of the patients should be analysed. Only such analyses may differentiate a transient carriage of genotypes always different from one sample to another (not clinically relevant) from a real chronic colonization of the airways by the



**FIG. 3.** Prolonged colonization by two distinct (patient C) (a) or closely related (patient D) (b) genotypes. Genotypes are represented by distinct colours. Underlined samples were culture-positive for *Aspergillus terreus*, but the isolates were not available for microsatellite analysis. An asterisk indicates a sample positive for *Aspergillus fumigatus*.

**FIG. 4.** Regular carriage of distinct genotypes found only transiently in patient E. Genotypes are represented by distinct colours. Underlined samples were culture-positive for *Aspergillus terreus*, but the isolates were not available for microsatellite analysis. An asterisk indicates a sample positive for *Aspergillus fumigatus*.

same genotype, which will contribute to the inflammatory reaction and to the progressive deterioration of lung function. Therefore, in addition to detection and precise identification of the fungal species colonizing the airways, genotyping may help

clinicians in their decision regarding whether or not to treat a patient, which may improve the quality of life of these patients.

In this study, seven genotypes were responsible for a prolonged or chronic colonization of the respiratory tract of CF patients, whereas 10 genotypes were found only transiently. Additional studies may further clarify whether certain *A. terreus* genotypes have inherent capacities to establish chronically in CF lungs. Moreover, two genotypes were involved in a chronic colonization of two patients in this study (i.e. genotype 8 in patient C and genotype 10 in patient A), whereas they were found only transiently in patient E. Involvement of some host factors in the establishment of a chronic colonization could be hypothesized, as suggested by Vanhee *et al.* [21] for colonization by *A. fumigatus* in the CF context. For instance, whereas all patients chronically colonized by *A. terreus* exhibited homozygosity for the F508del mutation, patient E harboured two moderate mutations (R709X/W79X) [24,25] that may have limited chronic colonization of the airways by filamentous fungi.

The large diversity of genotypes identified for patient E raises the question regarding the origin of colonization by this fungus [14,20]. In an epidemiological study performed at Hospital René Sabran (Giens, France) of air, surface and soil (from the hospital park) samples, *A. terreus* was detected exclusively in soil [7]. Additional analyses are warranted, particularly at patients' homes, to investigate a community-acquired colonization and to improve our knowledge on the environmental origin of this fungus. Given the frequent co-cultivation with the much more prevalent *A. fumigatus*, this requires the prior development of a selective culture medium and/or a molecular detection method specific to *A. terreus*.

## Acknowledgements

A. Rougeron, S. Giraud, B. Razafimandimby, J.P. Bouchara, J.F. Meis and C.H.W. Klaassen are members of the ECMM/ISHAM Working group on Fungal Respiratory Infections in Cystic Fibrosis (Fri-CF). This study was presented in part during the second meeting of this working group, September 2011, and during the poster session of the 18th ISHAM congress in Berlin, Germany, June 2012. The genomic sequence of *A. terreus* NIH 2624 was available through the *Aspergillus* Comparative Sequencing Project, Broad Institute of Harvard and MIT (<http://www.broadinstitute.org/>).

## Transparency Declaration

The authors declare no conflict of interest.

## Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

**Table S1.** Patient and sampling data.

**Table S2.** Genotypes of the isolates used in this study. Blank values indicate a lack of amplification product.

## References

- Bobadilla JL, Macek M, Fine JP, Farrell PM. Cystic fibrosis: a worldwide analysis of CFTR mutations-correlation with incidence data and application to screening. *Hum Mutat* 2002; 19: 575–606.
- Saiman L. Infection prevention and control in cystic fibrosis. *Curr Opin Infect Dis* 2011; 24: 390–395.
- Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in cystic fibrosis patients. *Chest* 2009; 137: 171–176.
- Pihet M, Carrère J, Cimon B et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis—a review. *Med Mycol* 2009; 47: 387–397.
- Lebecque P, Leonard A, Huang D et al. *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* and cystic fibrosis - prevalence and risk factors. *Med Mycol* 2010; 48 (Suppl 1): S4–S9.
- Cimon B, Carrère J, Chazalette J et al. Fungal colonization and immune response to fungi in cystic fibrosis. *J Mycol Méd* 1995; 5: 211–216.
- Cimon B, Zouhair R, Symoens F, Carrère J, Chabasse D, Bouchara JP. *Aspergillus terreus* in a cystic fibrosis clinic: environmental distribution and patient colonization pattern. *J Hosp Infect* 2003; 53: 81–82.
- Lass-Flörl C, Rath P, Niederwieser D et al. *Aspergillus terreus* infections in haematological malignancies: molecular epidemiology suggests association with in-hospital plants. *J Hosp Infect* 2000; 46: 31–35.
- Lass-Flörl C, Grif K, Kontoyiannis DP. Molecular typing of *Aspergillus terreus* isolates collected in Houston, Texas, and Innsbruck, Austria: evidence of great genetic diversity. *J Clin Microbiol* 2007; 45: 2686–2690.
- Symoens F, Bouchara JP, Heinemann S, Nolard N. Molecular typing of *Aspergillus terreus* isolates by random amplification of polymorphic DNA. *J Hosp Infect* 2000; 44: 273–280.
- Healy M, Reece K, Walton D, Huong J, Shah K, Kontoyiannis DP. Identification to the species level and differentiation between strains of *Aspergillus* clinical isolates by automated repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2004; 42: 4016–4024.
- Neal CO, Richardson AO, Hurst SF et al. Global population structure of *Aspergillus terreus* inferred by ISSR typing reveals geographical subclustering. *BMC Microbiol* 2011; 11: 203.
- de Valk HA, Klaassen CH, Meis JF. Molecular typing of *Aspergillus* species. *Mycoses* 2008; 51: 463–476.
- Balajee SA. *Aspergillus terreus* complex. *Med Mycol* 2009; 47: S42–S46.
- Bart-Delabesse E, Humbert JF, Delabesse E, Bretagne S. Microsatellite markers for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2413–2418.
- de Valk HA, Meis JF, Curfs IM, Muehlethaler K, Mouton JW, Klaassen CH. Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of *Aspergillus fumigatus* isolates. *J Clin Microbiol* 2005; 43: 4112–4120.
- Hadrich I, Makni F, Ayadi A, Ranque S. Microsatellite typing to trace *Aspergillus flavus* infections in a hematology unit. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2396–2401.
- An J, Bechet A, Berggren A et al. Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium. Permanent genetic resources added to molecular ecology resources database 1 October 2009–30 November 2009. *Mol Ecol Resour* 2010; 10: 404–408.
- Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B et al. *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2010; 48: 2381–2386.
- Varga J, Tóth B, Kocsubé S et al. Evolutionary relationships among *Aspergillus terreus* isolates and their relatives. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2005; 88: 141–150.
- Vanhee LM, Symoens F, Bouchara JP, Nelis HJ, Coenye T. High-resolution genotyping of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from chronically colonised patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2008; 27: 1005–1007.
- Rudramurthy SM, de Valk HA, Chakrabarti A, Meis JF, Klaassen CH. High resolution genotyping of clinical *Aspergillus flavus* isolates from India using microsatellites. *PLoS One* 2011; 6: e16086.
- de Valk HA, Klaassen CH, Yntema JB et al. Molecular typing and colonization patterns of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2009; 8: 110–114.
- Bonizzato A, Bisceglia L, Marigo C et al. Analysis of the complete coding region of the *CFTR* gene in a cohort of CF patients from north-eastern Italy: identification of 90% of the mutations. *Hum Genet* 1995; 95: 397–402.
- Férec C, Verlingue C, Guillermit H et al. Genotype analysis of adult cystic fibrosis patients. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1557–1560.

# Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight (MALDI-TOF) / Mass Spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species

Emilie Sitterlé<sup>1</sup>, Sandrine Giraud<sup>2</sup>, Julie Leto<sup>3</sup>, Jean Philippe Bouchara<sup>2</sup>, Amandine Rougeron<sup>2</sup>, Florent Morio<sup>4</sup>, Brunhilde Dauphin<sup>3</sup>, Cécile Angebault<sup>1</sup>, Gilles Quesne<sup>1</sup>, Jean Luc Beretti<sup>1</sup>, Noura Hassouni<sup>1</sup>, Xavier Nassif<sup>1</sup> and Marie-Elisabeth Bougnoux<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Service de Microbiologie, Hôpital Necker-Enfants-Malades AP-HP, Université René Descartes, Paris, France; <sup>2</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU d'Angers, Angers, France, <sup>3</sup>Andromas SAS, Paris, <sup>4</sup>Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU de Nantes, Nantes, France.

**An increasing number of infections due to *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species has been reported during the past decades, both in immunocompromised and immunocompetent patients. Additionally, these fungi are now recognized worldwide as common agents of fungal colonization of the airways in patients with cystic fibrosis, which represents a risk factor for disseminated infections after lung transplantation. Currently six species are described within the *Pseudallescheria* / *Scedosporium* genus, including *Scedosporium prolificans* and species of the *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* complex, i.e. *S. apiospermum sensu stricto*, *P. boydii*, *Scedosporium aurantiacum*, *Pseudallescheria minutispora* and *Scedosporium dehoogii*. Precise identification of clinical isolates at the species level is required since these species differ in their antifungal drug susceptibility patterns. Matrix-assisted laser desorption ionization (MALDI) - time of flight (TOF) / mass spectrometry (MS) is a powerful tool to rapidly identify molds at the species level. We investigated the potential of this technology to discriminate *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species. Thirty-nine reference strains were used to build a reference database library. Profiles from 3-, 5- and 7-day-old cultures of each reference strain were analyzed to identify species-specific discriminating profiles. The database was then tested for accuracy using a set of 58 clinical or environmental isolates previously identified by multi-locus sequencing. All these isolates were unequivocally identified at the species level by MALDI-TOF/MS. Our results, obtained using a simple protocol, without prior protein extraction nor standardization of the culture, demonstrate that MALDI-TOF/MS is a powerful tool for rapid identification of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species in the clinical setting, including those belonging to the *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* complex that cannot be currently identified by morphological examination.**

\*Corresponding author: Dr Marie-Elisabeth Bougnoux, MD, PhD. Service de Microbiologie, Hôpital Necker-Enfants Malades, 146 rue de Sèvres, 75015 Paris, France. Tel : 33 (0)1 44 49 49 61 - Fax : 33 (0)1 44 49 49 60. Email : marie-elisabeth.bougnoux@nck.aphp.fr

## Introduction

*Pseudallescheria/Scedosporium* species are ubiquitous filamentous fungi commonly found in human-impacted environments, particularly highly polluted soils and waters [1]. These thermotolerant molds are opportunistic pathogens causing severe and often fatal infections in immunocompromised patients, such as bone marrow or solid organ transplant recipients. They may also cause systemic mycoses in immunocompetent individuals, including cerebral infections after near-drowning [1-3]. Additionally, *Pseudallescheria/Scedosporium* species are the second filamentous fungi involved in the colonization of the respiratory tract of patients with cystic fibrosis (CF) [4-6]. In these patients, a chronic colonization of the airways by *Scedosporium prolificans* or species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex is increasingly considered by clinicians. Indeed, a major risk of invasive infection after lung transplantation has been reported due to the propensity of these fungi to disseminate in case of immunodeficiency and their low susceptibility to current antifungal drugs [7].

Until recently, only two clinically important *Scedosporium* species were described: *Scedosporium prolificans* and *S. apiospermum* (previously considered as the *P. boydii* anamorph). However, thanks to multi-locus sequencing (MLS) along with morphological and physiological studies, *S. apiospermum* is now considered as a distinct species (*Pseudallescheria apiosperma* being its teleomorph) and three new species are described within the *P. boydii / S. apiospermum* complex, *i.e.* *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium dehoogii* and *Pseudallescheria minutispora* [8,9]. *Scedosporium apiospermum*, *P. boydii* and *S. aurantiacum* are the most common human pathogens of this species complex, *P. minutispora* and *S. dehoogii* being only described in a couple of patients [10-12], (Morio *et al.*, unpublished observation). The accurate identification of clinical isolates at the species level is of overall importance because the antifungal susceptibility can differ between species. However, due to the lack of specific phenotypic characteristics and the high degree of morphological diversity, the morphological identification of *Pseudallescheria / Scedosporium* species is challenging [13].

Matrix-assisted laser desorption ionization - time of flight / mass spectrometry (MALDI-TOF/MS) is now increasingly used for routine phenotypic identification of bacterial and yeast species [14-16]. Moreover, recent studies have reported the efficiency of MALDI-TOF/MS for rapid identification of molds [17,18]. Nevertheless, an exhaustive mass spectral library is still missing for the identification of *Pseudallescheria / Scedosporium* species [19].

Here, we developed a specific database for the identification of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species by MALDI-TOF/MS. This database was then evaluated on a large number of clinical and environmental isolates. Our findings highlight that MALDI-TOF/MS is a reliable, fast and accurate method for the routine identification of species belonging to the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex and *S. prolificans*.

## Materials and Methods

### *Strains and culture conditions*

This study was conducted using two sets of strains or isolates. The first set, used to build the reference database, consisted of 39 reference strains belonging to the following clinically relevant *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species: *P. boydii* (n = 20), *S. apiospermum* (n = 11), *S. aurantiacum* (n = 4), *P. minutispora* (n = 2), *S. dehoogii* (n = 1) and *S. prolificans* (n = 1) (Table 1). The second set, made of 58 clinical (n = 54) or environmental isolates (n = 4) obtained from different hospitals in France, was used to evaluate the new *Pseudallescheria* / *Scedosporium* MALDI-TOF/MS database engineered in this study. Isolates were previously identified by conventional methods, including macroscopic and microscopic morphological investigations. Species identification was also performed by multi-locus sequence analysis (considered as the gold standard method) relying on PCR amplification and sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) regions 1 and 2 of the ribosomal RNA genes, one region in the calmodulin gene (CAL) and two regions within the  $\beta$ -tubulin gene (TUB and BT2), as previously described [9].

All reference strains and tested isolates were grown at 30°C from 3 to 7 days on Sabouraud dextrose agar plates containing chloramphenicol and gentamicin (BD BBL™ Stacker™ Plates, Becton-Dickinson, Germany).

**Table 1** Reference strains used to establish the MALDI-TOF/MS database (n = 39).

Species	Strain number	Geographical origin	Isolation date (year/month/day)	Clinical context	GenBank accession number			
					ITS	CAL	BT2	TUB
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23566	Angers	2005/01/11	CF	JQ690902	JQ691065	JQ690955	JQ691008
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23582	Angers	2006/06/03	CF	JQ690905	JQ691068	JQ690958	JQ691011
<i>Pseudallescheria boydii</i>	40504117/1	Angers	2005/06/24	CF	JQ690906	JQ691069	JQ690959	JQ691012
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23569	Angers	2007/08/09	CF	JQ690907	JQ691070	JQ690960	JQ691013
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 14354	Giens	1998/01/19	CF	JQ690910	JQ691073	JQ690963	JQ691016
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 13943	Giens	1992/04/23	CF	JQ690912	JQ691075	JQ690965	JQ691018
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23567	Caen	2006/04/14	CF	JQ690915	JQ691078	JQ690968	JQ691021
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 14361	Tours	1998/02/16	CF	JQ690919	JQ691082	JQ690972	JQ691025
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23574	Angers	2007/05/09	CF	JQ690920	JQ691083	JQ690973	JQ691026
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 15466	Giens	1998/11/09	CF	JQ690922	JQ691085	JQ690975	JQ691028
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23579	Giens	2008/04/07	CF	JQ690932	JQ691095	JQ690985	JQ691038
<i>Pseudallescheria boydii</i>	080331879	Toulouse	2008/08/13	CF	JQ690935	JQ691098	JQ690988	JQ691041
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23581	Toulouse	2008/06/04	CF	JQ690939	JQ691102	JQ690992	JQ691045
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23828	Giens	2009/04/17	CF	JQ690940	JQ691103	JQ690993	JQ691046
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23825	Giens	2008/11/10	CF	JQ690942	JQ691105	JQ690995	JQ691048
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23832	Giens	2008/09/03	CF	JQ690943	JQ691106	JQ690996	JQ691049
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23826	Angers	2009/11/26	CF	JQ690944	JQ691107	JQ690997	JQ691050
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23834	Angers	2008/04/03	CF	JQ690947	JQ691110	JQ691000	JQ691053
<i>Pseudallescheria boydii</i>	100152417-01	Giens	2010/02/24	CF	JQ690948	JQ691111	JQ691001	JQ691054
<i>Pseudallescheria boydii</i>	IHEM 23827	Rouen	2008/08/01	CF	JQ690949	JQ691112	JQ691002	JQ691055
<i>Scedosporium apiospermum</i>	IHEM 14268	Giens	1998/01/08	CF	JQ690913	JQ691076	JQ690966	JQ691019
<i>Scedosporium apiospermum</i>	IHEM 14766	Tours	1998/08/11	CF	JQ690916	JQ691079	JQ690969	JQ691022
<i>Scedosporium apiospermum</i>	IHEM 15150	Giens	1998/09/22	CF	JQ690918	JQ691081	JQ690971	JQ691024
<i>Scedosporium apiospermum</i>	IHEM 23576	Angers	2002/04/22	CF	JQ690924	JQ691087	JQ690977	JQ691030
<i>Scedosporium apiospermum</i>	IHEM 23577	Paris (Necker)	2003/01/23	CF	JQ690926	JQ691089	JQ690979	JQ691032
<i>Scedosporium apiospermum</i>	IHEM 13940	Angers	1991/12/23	CF	JQ690928	JQ691091	JQ690981	JQ691034
<i>Scedosporium apiospermum</i>	IHEM 13942	Giens	1992/06/15	CF	JQ690929	JQ691092	JQ690982	JQ691035
<i>Scedosporium apiospermum</i>	IHEM 23580	Toulouse	2008/05/06	CF	JQ690934	JQ691097	JQ690987	JQ691040
<i>Scedosporium apiospermum</i>	100353188-01	Rouen	2007/07/18	CF	JQ690936	JQ691099	JQ690989	JQ691042
<i>Scedosporium apiospermum</i>	IHEM 23824	Giens	2009/07/21	CF	JQ690941	JQ691104	JQ690994	JQ691047
<i>Scedosporium apiospermum</i>	IHEM 23836	Giens	2010/02/17	CF	JQ690946	JQ691109	JQ690999	JQ691052
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	40503256	Angers	2005/05/23	CF	JQ690903	JQ691066	JQ690956	JQ691009
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	1007M230067	Paris (Necker)	2010/07/23	CF	NA	NA	NA	NA
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	IHEM 23578	Tours	2008/05/06	CF	JQ690931	JQ691094	JQ690984	JQ691037
<i>Scedosporium aurantiacum</i>	07070660	Rouen	2007/07/18	CF	JQ690938	JQ691101	JQ690991	JQ691044
<i>Scedosporium dehoogii</i>	1107M210058	Nantes	2009/04/02	Osteitis	NA	NA	NA	NA
<i>Scedosporium prolificans</i>	680	Paris (Cochin)	NA	NA	NA	NA	NA	NA
<i>Pseudallescheria minutispora</i>	IHEM 23572	Angers	2006/03/08	CF	JQ690914	JQ691077	JQ690967	JQ691020
<i>Pseudallescheria minutispora</i>	IHEM 23837	Angers	2003/05/06	CF	JQ690945	JQ691108	JQ690998	JQ691051

ITS : internal transcribed spacer regions 1 and 2 of ribosomal RNA genes; CAL: calmodulin gene; BT2 and TUB: two distinct regions in the beta-tubulin gene.

CF: cystic fibrosis

NA: not available

## MALDI-TOF/MS

**(1) Sample preparation.** All strains or isolates used to engineer and validate the database were grown at 30°C and checked daily for maturation (sufficient sporulation and mycelium development). The surface of the colonies was scraped using a sterile swab and the fungal mass was mixed with 1.5 µl of formic acid (70% v/v) previously deposited on a target plate (Andromas, Paris, France). After drying at room temperature, one microliter of matrix solution HCCA (saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 50% acetonitrile, 2.5% trifluoroacetic acid) was added to each well, and then allowed to cocrystallize with the sample. Strains used for the database construction was deposited in 10 replicates while isolates used to validate the database were tested in 2 replicates.

**(2) Instrument type.** All samples were processed using the Andromas system (Paris, France). This system includes a mass spectrometry apparatus combined with a control software and various databases for identification of bacteria, yeasts or filamentous fungi [20-22]. For each

sample, positive ions were extracted with an accelerating voltage of 20 kV in linear mode. The spectra were analyzed and compared over an  $m/z$  range of 3,000 to 20,000 with the Andromas software (Paris, France).

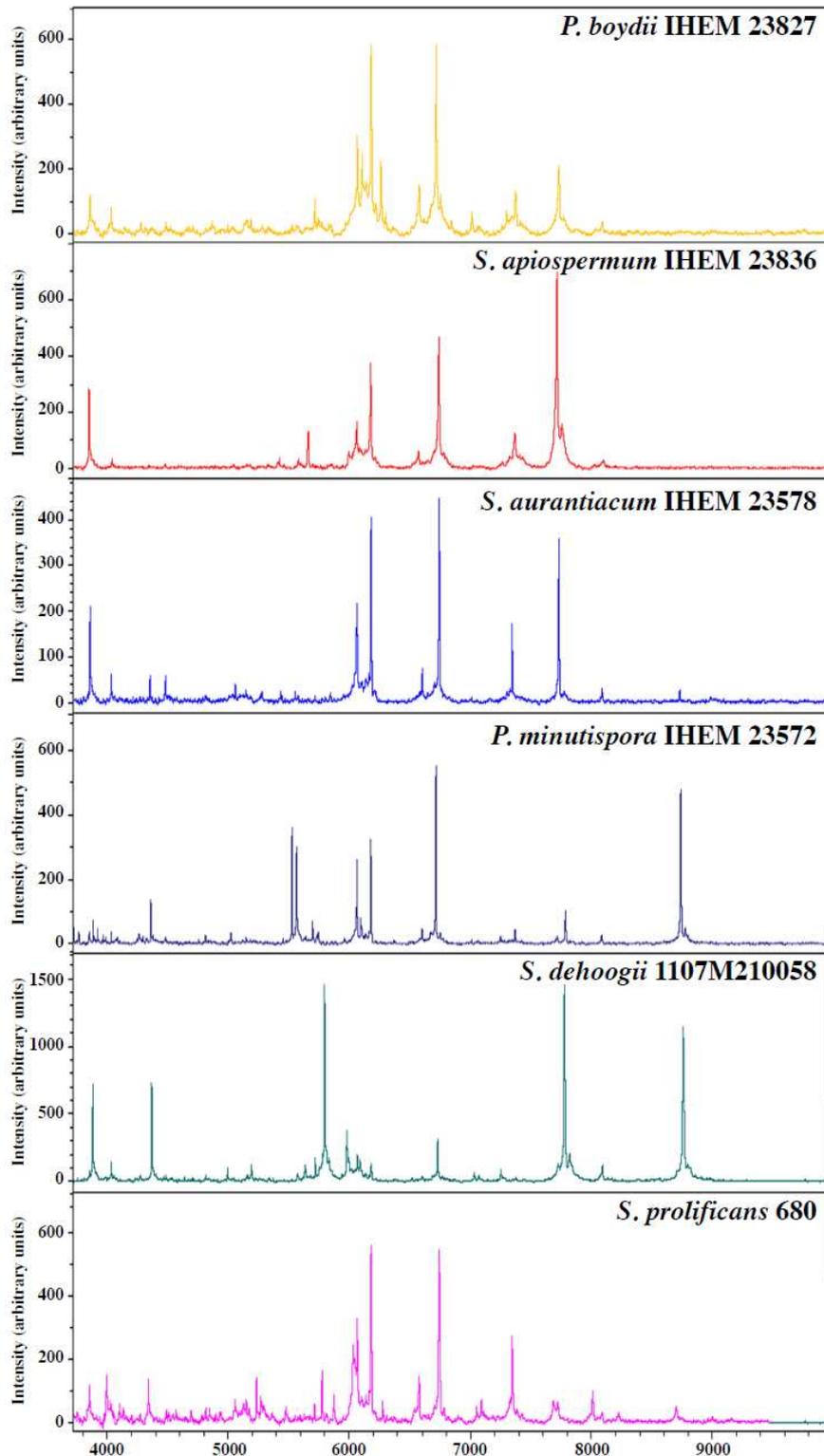
(3) Data analysis. For the *Pseudallescheria / Scedosporium* database construction, the Andromas software identified the number of common peaks in the spectra obtained for the different reference strains tested and defined species-specific spectral fingerprints. For each isolate used for the validation step of the database, only peaks with an intensity higher than 0.1 were considered and their profiles were compared with the species-specific spectral fingerprint, taking into account possible variations in the  $m/z$  value of  $\pm 10 m/z$ . The percentage of common peaks was obtained with the following formula:  $100 \times (\text{number of peaks common between the peaks of the tested isolate and the peaks of the species-specific spectral fingerprint} / \text{total number of peaks specific to the species-specific spectral fingerprint})$ . Species identification for a tested isolate was considered acceptable when  $\geq 70\%$  of the peaks were shared with the reference strains in the database. Only the first and second best matches were considered. A difference of at least 10% between the first and the second match was required. When the identification was not acceptable (*i.e.*  $< 70\%$  of peaks shared with the reference strains or  $< 10\%$  difference between the first and second matches), a second run was performed and the results were analyzed in a similar manner. An external control (*Pseudomonas aeruginosa*) was used to validate the calibration for each experiment [22].

## Results

### *Reference database*

The database for *Pseudallescheria / Scedosporium* species identification was engineered using a previously described strategy [18,22]. A set of reference strains belonging to the clinically relevant *Pseudallescheria / Scedosporium* species and described in Materials and Methods was used to construct the mass spectral database. The MALDI-TOF/MS spectra obtained from 10 different runs were analyzed for each reference strain. The majority of ions detected was in the range of 4,000 to 14,000 Da. For each reference strain, only peaks with a relative intensity greater than 0.1 and constantly present in all spectra obtained for a given species were considered. The standard deviation for each conserved peak did not exceed a 6  $m/z$  value. As some differences were observed in the spectra obtained from young and mature colonies within a same species, profiles from colonies at different

incubation times (3-, 5- and 7-day-old cultures) were analyzed for each reference strain. Although some of the studied species shared common peaks, the whole set of peaks, called spectral fingerprints, was specific for each reference strain. Figure 1 shows an example of the spectral fingerprints obtained for the six *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species.



**Fig. 1** MALDI-TOF/MS reference spectra of clinically relevant *Pseudallescheria*/ *Scedosporium* species.

### Validation of the database

We next aimed at determining whether the above database could be used for routine identification of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species. The database was tested blindly with a set of 54 clinical (19 *P. boydii*, 23 *S. apiospermum*, 6 *S. aurantiacum*, 3 *P. minutispora*, 1 *S. dehoogii* and 2 *S. prolificans*) and 4 environmental (3 *S. dehoogii* and 1 *P. minutispora*) isolates.

The results of MALDI-TOF/MS identification were compared to those obtained by multi-locus sequence analysis (Table 2). Both methods were in perfect agreement, since our MALDI-TOF/MS strategy allowed correct species identification for all the isolates tested (58/58).

**Table 2** Identification of clinical and environmental isolates (n = 58) of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species by MALDI-TOF/MS using the Andromas system.

Species	Number of species accurately identified by MALDI-TOF/MS (%)
<i>P. boydii</i> (n = 19)	19 (100)
<i>S. apiospermum</i> (n = 23)	23 (100)
<i>S. aurantiacum</i> (n = 6)	6 (100)
<i>P. minutispora</i> (n = 4)	4 (100)
<i>S. dehoogii</i> (n = 4)	4 (100)
<i>S. prolificans</i> (n = 2)	2(100)

### Discussion

This study shows that our MALDI-TOF/MS system is a rapid and powerful technique for the accurate identification of clinically relevant *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species. Indeed, the Andromas system combined with the newly constructed database was able to discriminate all isolates tested with a high rate (100%) of correct identification at the species level.

The taxonomy of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species is highly complex [23]. In addition to the well-known *S. prolificans*, five other species belonging to the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex have recently been described: *S. apiospermum*, *P. boydii*, *S. aurantiacum*, *P. minutispora* and *S. dehoogii* [8,9]. Species of this complex are morphologically indistinguishable from each other on simple phenotypic traits commonly used in the laboratory. Our results show that the Andromas MALDI-TOF/MS system allows precise identification of these sibling species using a very simple and rapid experimental procedure without laborious sample preparation steps, such as subculture or prior protein extraction. The mass spectral database developed in this study includes species-specific spectral fingerprints from colonies of varying age (3-, 5- and 7-day-old cultures).

Consequently, precise species identification can be performed regardless of the maturity of the colony. Altogether, the identification of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species by MALDI-TOF/MS offers several advantages over the conventional methods currently used for the identification of this group of filamentous fungi. The MLS strategy, considered as the gold standard for the accurate identification of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species, requires an experienced staff, is expensive and time-consuming, taking several days for DNA extraction, PCR amplification of the target genes and sequencing [23]. Another molecular approach, recently developed, is the semi-automated rep-PCR that is based on PCR amplification of different sized repetitive sequences interspersed throughout the genome. This easy-to-perform method provides same-day results and has proven to be a powerful tool to track the source and spread of microbial infection, allowing quick and accurate differentiation of microbial isolates at the subspecies and strain level. Regarding *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species, this system showed a high degree of reproducibility, discriminating species of the *P. boydii* / *S. apiospermum* complex from other filamentous fungi, including *S. prolificans* [24]. However, rep-PCR could not discriminate *P. boydii* isolates from those of *S. apiospermum*, perhaps in relation with the high polymorphism in the genome of these sibling species and its high degree of recombination.

The accurate identification to the species level of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species is also of clinical importance because of the inter-species variability in both virulence and *in vitro* susceptibility to antifungal agents [13,25,26]. Indeed, whereas *S. apiospermum* and *P. boydii* have close antifungal susceptibility patterns, *S. aurantiacum*, *S. prolificans* and *S. dehoogii* present notably different patterns. In particular, *S. prolificans* and *S. aurantiacum* are less susceptible than other species to all current systemic antifungal drugs [13]. These species are also more virulent than the others in experimental models and the mortality rate associated with *S. prolificans* infection is particularly high [26]. It is therefore particularly important to precisely and rapidly differentiate these two species from the other species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium*.

One limitation of our study concerns the uncommon species that are *S. dehoogii*, *S. prolificans* and *P. minutispora*. Indeed, the number of reference strains included in the database was limited, which may affect the identification performance. Likewise, few clinical isolates of these species were available for validation of the database.

In conclusion, MALDI-TOF/MS represents a powerful tool to discriminate *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species and could replace molecular methods for routine identification in

clinical laboratories. It should be helpful to enable the early adaptation of antifungal therapy and to avoid microbiological therapeutic failure in case of infection due to species with an innate resistance to antifungal drugs. In addition, MALDI-TOF/MS technology provides a real opportunity to improve our knowledge of the epidemiology and ecology of clinically relevant *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species, by allowing fast and accurate species identification. Ultimately, from a better knowledge about the reservoirs of these fungi, it should be possible to implement prophylactic measures aiming to prevent the colonization of the airways by these opportunistic pathogens in CF patients.

## Acknowledgements

We thank André Paugam (Paris, Cochin University Hospital), Loïc Favennec (Rouen University Hospital), Jacqueline Carrère (Giens Hospital), Eric Bailly (Tours University Hospital), Julie Bonhomme (Caen University Hospital) and Sophie Cassaing (Toulouse University Hospital) for providing clinical isolates of *Pseudallescheria* / *Scedosporium* species.

## Transparency Declaration

J.L. Beretti, X. Nassif and M.E. Bougnoux are shareholders of Andromas SAS. B. Dauphin and J. Leto are employed by Andromas SAS.

## References

1. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, *et al.* Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev*, 2008, **21**: 157-197.
2. Husain S, Munoz P, Forrest G, *et al.* Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* in transplant recipients: clinical characteristics and impact of antifungal agent therapy on outcome. *Clin Infect Dis*, 2005, **40**: 89-99.
3. Guarro J, Kantarcioglu AS, Horre R, *et al.* *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol*, 2006, **44**: 295-327.
4. Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, *et al.* Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, **19**(1):53-56.
5. Paugam A, Baixench MT, Demazes-Dufeu N, *et al.* Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. *Med Mycol*, 2010, **48 Suppl 1**: S32-36.
6. Horre R, Marklein G, Siekmeier R, Nidermajer S, Reiffert SM. Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients. *Respiration*, 2009, **77**: 320-324.

7. Morio F, Horeau-Langlard D, Gay-Andrieu F, *et al.* Disseminated *Scedosporium* / *Pseudallescheria* infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol*, 2010, **48**(5):1978-1982.
8. Gilgado F, Cano J, Gene J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *J Clin Microbiol*, 2008, **46**: 766-771.
9. Gilgado F, Cano J, Gene J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *J Clin Microbiol*, 2005, **43**: 4930-4942.
10. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, *et al.* Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med Mycol*, 2010, **48 Suppl 1**: S37-44.
11. Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, *et al.* Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Med Mycol*, 2013, **51**(6):603-613.
12. Lu Q, Gerrits van den Ende AH, Bakkers JM, *et al.* Identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species by three molecular methods. *J Clin Microbiol*, 2011, **49**: 960-967.
13. Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, *et al.* Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrob Agents Chemother*, 2012, **56**: 2635-2642.
14. Ferroni A, Suarez S, Beretti JL, *et al.* Real-time identification of bacteria and *Candida* species in positive blood culture broths by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2010, **48**: 1542-1548.
15. Giebel R, Worden C, Rust SM, *et al.* Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges. *Adv Appl Microbiol*, 2010, **71**: 149-184.
16. Carbonnelle E, Mesquita C, Bille E, *et al.* MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory. *Clin Biochem*, 2011, **44**: 104-109.
17. Santos C, Paterson RR, Venancio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol* 2010, **108**: 375-385.
18. Alanio A, Beretti JL, Dauphin B, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry for fast and accurate identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Infect*, 2011, **17**: 750-755.
19. Coulibaly O, Marinach-Patrice C, Cassagne C, *et al.* *Pseudallescheria/Scedosporium* complex species identification by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Med Mycol*, 2011, **49**: 621-626.

20. Bille E, Dauphin B, Leto J, *et al.* MALDI-TOF MS Andromas strategy for the routine identification of bacteria, mycobacteria, yeasts, *Aspergillus* spp. and positive blood cultures. *Clin Microbiol Infect*, 2012, **18**: 1117-1125.
21. Degand N, Carbonnelle E, Dauphin B, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of nonfermenting gram-negative bacilli isolated from cystic fibrosis patients. *J Clin Microbiol*, 2008, **46**: 3361-3367.
22. Alshawa K, Beretti JL, Lacroix C, *et al.* Successful identification of clinical dermatophyte and *Neoscytalidium* species by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*, 2012, **50**: 2277-2281.
23. Gilgado F, Gene J, Cano J, Guarro J. Heterothallism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleomorph *Pseudallescheria apiosperma* sp. nov. *Med Mycol*, 2010, **48**: 122-128.
24. Steinmann J, Schmidt D, Buer J, Rath PM. Discrimination of *Scedosporium prolificans* against *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium apiospermum* by semi-automated repetitive sequence-based PCR. *Med Mycol*, 2011, **49**: 475-483.
25. Harun A, Serena C, Gilgado F, Chen SC, Meyer W. *Scedosporium aurantiacum* is as virulent as *Scedosporium prolificans*, and shows strain-specific virulence differences, in a mouse model. *Med Mycol*, 2010, **48 Suppl 1**: S45-51.
26. Gilgado F, Cano J, Gene J, Serena C, Guarro J. Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Med Mycol*, 2009, **47**: 371-374.

# Thèse de Doctorat

Amandine ROUGERON

## Distribution dans la mucoviscidose et écologie des différentes espèces du complexe *Scedosporium apiospermum*

Distribution in the cystic fibrosis context and ecology of the different species of the *Scedosporium apiospermum* complex

### Résumé

Le complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* se situe au deuxième rang des champignons filamenteux isolés des expectorations de patients atteints de mucoviscidose, maladie génétique la plus fréquente dans la population caucasienne et dont le pronostic est étroitement lié à l'atteinte respiratoire.

La distribution des cinq espèces constituant ce complexe a été étudiée au sein d'une cohorte de patients français atteints de mucoviscidose. Nos résultats suggèrent que *P. boydii* est l'espèce prédominante (62%), suivie de *S. apiospermum* (24%), *Scedosporium aurantiacum* (10%) et *Pseudallescheria minutispora* (4%). Nous avons également démontré la capacité de ces deux dernières espèces à coloniser de manière chronique les voies respiratoires de ces patients.

Les niches naturelles et les réservoirs de ces espèces constituant des sources potentielles de contamination humaine ont ensuite été étudiées dans la région Pays-de-la-Loire. Les densités les plus importantes de ces espèces ont été retrouvées dans les zones impactées par les activités humaines. *Scedosporium dehoogii* est l'espèce la plus abondante ; *S. aurantiacum*, *P. boydii* et *S. apiospermum* ont été principalement retrouvées dans les zones agricoles, les plages et les aires de jeux, respectivement.

Les techniques de PCR étant plus rapides et plus sensibles que les méthodes culturales et permettant une semi-quantification, nous avons enfin développé une méthode moléculaire pour la détection et la quantification du complexe *P. boydii* / *S. apiospermum*. Cependant, une optimisation de l'étape d'extraction d'ADN génomique est nécessaire pour permettre l'application de cette méthode à des échantillons de sol.

### Mots clés

Complexe *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum*, mucoviscidose, écologie.

### Abstract

The *Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* species complex ranks second among the filamentous fungi isolated from sputum samples of patients with cystic fibrosis, the most common genetic inherited disease in the Caucasian population and whose prognosis is closely related to respiratory functional deterioration.

Distribution of the five different species of the complex was investigated in French patients with cystic fibrosis. Our results suggest that *P. boydii* is the predominant species (62%), followed by *S. apiospermum* (24%), *Scedosporium aurantiacum* (10%) and *Pseudallescheria minutispora* (4%). We also demonstrated the ability of these two species to chronically colonize the respiratory tract of patients with cystic fibrosis.

Natural niches and reservoirs of these species that are potential sources of human contamination were then studied in the Pays-de-la-Loire region, France. The highest densities of these species were found in human-impacted areas. *Scedosporium dehoogii* is the most abundant species; *S. aurantiacum*, *P. boydii* and *S. apiospermum* were mainly found in agricultural areas, seashores and playgrounds, respectively.

As PCR techniques are faster and more sensitive than cultural methods and allow semi-quantification, we finally developed a molecular method for detection and quantification of the *P. boydii* / *S. apiospermum* species complex. However, an optimization of the DNA extraction step is required for application on soil samples.

### Key Words

*Pseudallescheria boydii* / *Scedosporium apiospermum* complex, cystic fibrosis, ecology.