



**HAL**  
open science

# Caractérisation moléculaire et épidémiologique de pathogènes fongiques émergents dans la mucoviscidose : scedosporium spp et Rasamsonia spp

Abdelmounaim Mouhajir

► **To cite this version:**

Abdelmounaim Mouhajir. Caractérisation moléculaire et épidémiologique de pathogènes fongiques émergents dans la mucoviscidose : scedosporium spp et Rasamsonia spp. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers; Université Moulay Ismaïl (Meknès, Maroc), 2018. Français. NNT : 2018ANGE0049 . tel-02426231

**HAL Id: tel-02426231**

**<https://theses.hal.science/tel-02426231>**

Submitted on 2 Jan 2020

**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 en Cotutelle Internationale

Présentée par:

**MOUHAJIR Abdelmounaim**

En vue de l'obtention du Doctorat en **Biologie**

Spécialité : **Microbiologie**

**Caractérisation moléculaire et épidémiologique  
de pathogènes fongiques émergents dans la mucoviscidose:  
*Scedosporium spp* et *Rasamsonia spp***

**Soutenue le 5 février 2018, devant le jury composé de:**

<b>Mr. Loic FAVENNEC</b>	PU-PH, Université de Rouen, Rouen France	<b>Président</b>
<b>Mr. Sa�id AMIRI</b>	PES, Ecole Nationale d'Agriculture, Meknès, Maroc	<b>Rapporteur</b>
<b>Mme. Majida HAFIDI</b>	PES, Université Moulay Ismail, Meknès, Maroc	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr. Stéphane RANQUE</b>	MCU-PH, Université d'Aix-Marseille, Marseille, France	<b>Rapporteur</b>
<b>Mr. Hassan HAJJAJ</b>	PES, Université Moulay Ismail, Meknès, Maroc	<b>Examineur</b>
<b>Mr. Jean-Philippe BOUCHARA</b>	PU-PH, Université d'Angers, Angers France	<b>Directeur de thèse</b>
<b>Mr. Rachid ZOUHAIR</b>	PES, Université Moulay Ismail, Meknès, Maroc	<b>Directeur de thèse</b>

## **AVANT-PROPOS**

Ce travail de doctorat a été réalisé dans le cadre  
d'une convention de cotutelle internationale de thèse  
entre **l'UNIVERSITE MOULAY ISMAIL de MEKNES (MAROC)**  
et **l'UNIVERSITE d'ANGERS (FRANCE)**,

sous la responsabilité de deux directeurs de thèse :

- Pr. Rachid ZOUHAIR de l'Université Moulay Ismail de Meknès  
Laboratoire : **Laboratoire de Biotechnologies Végétales  
et de Biologie Moléculaire**
- Pr. Jean-Philippe BOUCHARA de l'Université d'Angers  
Laboratoire : **Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène**

*Avec beaucoup d'émotions je trace ces lignes et je dédie cet humble travail  
À la mémoire de mon cher père Ahmed Mouhajir,  
Tu as toujours montré ton enthousiasme et ta fierté au sujet de mes études,  
J'aurais tellement aimé te montrer ce manuscrit,  
J'aurais tellement aimé que tu sois présent à ma soutenance ...*

# Remerciements

---

*Mes très vifs remerciements vont aux membres du jury et notamment à **Monsieur le Professeur Loïc Favennec** qui m'a fait l'honneur de présider mon jury de thèse;*

*À **Madame le Professeur Majida Hafidi, Monsieur le Professeur Saïd Amiri et Monsieur le Docteur Stéphane Ranque**, d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse ;*

*À **Monsieur le Professeur Hassan Hajjaj** qui ont accepté d'être examinateur.*

*Je vous suis très reconnaissant pour le temps que vous avez consacré à la lecture, l'analyse et la critique de ce travail.*

*Je remercie chaleureusement toutes les personnes qui m'ont aidé pendant toutes ces années de recherche doctorale.*

*Je remercie infiniment mes directeurs de thèse, **Monsieur le Professeur Jean-Philippe Bouchara et Monsieur le Professeur Rachid Zouhair** pour la confiance qu'ils m'ont accordée en acceptant la direction de cette thèse. Je vous suis reconnaissant d'apporter à ce travail votre regard d'expert ainsi que de votre grande disponibilité et de votre patience durant les longues périodes de rédaction. Soyez assurés messieurs de ma profonde gratitude.*

*Mes sincères remerciements à **Madame le Docteur Sandrine Giraud** pour avoir co-encadré ce travail. Je vous remercie de m'avoir fait largement bénéficier de vos compétences et je vous exprime ma profonde gratitude.*

*Je remercie tous les membres et anciens membres du Groupe d'Etude des Interaction Hôte-Pathogène. Ce travail n'aurait pu être mené à bien sans la disponibilité et l'accueil chaleureux que m'ont témoignés **Agnès, Charlotte, Gaëlle, Julia, Maxime et Patrick**.*

*Merci aux docteurs **Tram, Amandine, Sarah, Sara, Amani et Cindy**, j'ai été honoré de faire votre connaissance et je vous souhaite une bonne continuation dans vos parcours professionnels.*

*Je remercie aussi les stagiaires **Corentin et Florian** pour leur participation à la lourde tâche de la mise en culture des échantillons de sols et au dénombrement, isolement et purification des colonies fongiques.*

*Durant cette thèse, j'ai eu l'honneur et le privilège de travailler dans le cadre de plusieurs collaborations.*

*Je tiens à remercier profondément **Monsieur le Professeur Loïc Favennec** pour l'engagement que vous avez montré tout au long de notre collaboration. Je vous remercie de m'avoir accueilli au sein de votre laboratoire pour réaliser les analyses rep-PCR. Merci à l'ensemble de l'équipe du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie du CHU de Rouen et plus particulièrement à **Olivier, Ophélie, Cédric, Romy** et **Monsieur le Docteur Gilles Gargala**. Je me souviendrai toujours de votre accueil chaleureux et de la soirée restau au milieu de l'hiver normand.*

*Je remercie vivement **Monsieur le Professeur Rachid Bouabid**, de m'avoir accueilli au sein de son équipe au laboratoire Ferti-conseil à l'Ecole Nationale d'Agriculture de Meknès, pour réaliser les analyses physico-chimiques des échantillons de sol. Je remercie aussi **Ilhame, Khaled** et **Mohamed** pour l'accueil chaleureux et leur engagement pour la réalisation des ces analyses.*

*Je remercie vivement **Madame le Docteur Marie-Elisabeth Bounoux** de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire pour réaliser l'identification des espèces par MALDI-TOF. Je remercie aussi **Cécile, Julie, Stéphanie, Jean-Luc** et toute l'équipe du Laboratoire de Parasitologie-Mycologie de l'Hôpital Necker à Paris.*

*Je tiens également à remercier les membres du laboratoire de Biotechnologies végétales et de Biologie moléculaire de l'université Moulay Ismail. Merci à mes chers **Professeurs Majida Hafidi, Hassan Hajjaj** et **Hamid Mazouz** de m'avoir toujours encouragé.*

*Je remercie aussi l'association **Vaincre La Mucoviscidose**, pour avoir financé une partie de ce travail.*

*Au terme de ce parcours, je remercie enfin celles et ceux qui me sont chers*

*Mes ami(e)s*

***Adnane, Dris, Hamza, Jamal, Saïd, Slimane** et **Zakaria**, je sais que je peux toujours compter sur vous...*

*Une pensée toute particulière à **Imane** et **Omar**, vous étiez toujours présents... Merci!*

*Merci **Amin** et **Mohammad** de votre soutien et de votre accueil, toujours chaleureux, pendant mes petits passages à Angers. J'espère vous revoir bientôt.*

*Ma famille,*

*Ma chère maman, la source inépuisée d'amour et de bonheur. Ton amour, tes prières et ton soutien inconditionnel me procurent toujours une grande confiance.*

*Mes sœurs **Faiza**, **Bouchra** et **Hassana** et leurs familles; mes frères **Rachid** et **Khalid** et leurs familles. Je vous aime tous et j'espère seulement être à la hauteur des sacrifices que vous avez faits pour moi.*

*Je remercie également mes cousins en France, les familles **Itlaha** à Paris et à Châteauroux et les familles **Boussaidi** et **Kiouech** à Châteauroux.*

*Je vous remercie tous avec grande émotion et je vous dis que  
«Quand on est comme moi, ça reconforte de savoir que, qu'il pleuve ou qu'il vente, il y a  
toujours quelque part une bonne soupe qui vous attend. »*

## RÉSUMÉ

Dans la mucoviscidose, le tableau clinique est dominé par les infections respiratoires qui constituent la cause majeure de morbidité. Diverses espèces fongiques sont décrites dans ces infections, notamment les *Scedosporium* et le complexe *Rasamsonia argillacea* pour lesquels les connaissances restent limitées. Dans ce travail, nous avons évalué l'intérêt de l'amplification des séquences répétitives de l'ADN pour la différenciation spécifique et infraspécifique de ces champignons. La rep-PCR a d'abord été appliquée à l'analyse d'isolats du genre *Scedosporium*. La rep-PCR a produit des résultats concordants avec ceux obtenus par séquençage du gène de la bêta-tubuline, amplification aléatoire de fragments d'ADN polymorphes et séquençage multi-loci. Elle permet également l'identification précise des espèces au sein du complexe *R. argillacea*. L'analyse des résultats obtenus sur 116 isolats a montré la capacité de ces champignons à coloniser de manière chronique les voies respiratoires, un même profil électrophorétique étant observé généralement chez un même patient. Enfin, nous avons produit de nouvelles données sur l'écologie des *Scedosporium* en étudiant différents biotopes au Maroc. Comme précédemment rapporté, ces champignons préfèrent les environnements impactés par les activités humaines. On les rencontre dans des sols de pH neutre, riches en matières organiques et pauvres en sels. Enfin, si *S. apiospermum* était l'espèce la plus abondante, *S. boydii*, *S. aurantiacum* et *S. dehoogii* ont été rencontrés avec des fréquences comparables. En conclusion, les données générées renforcent nos connaissances sur l'épidémiologie des infections causées par ces pathogènes émergents.

### Mots clés

Mucoviscidose, *Scedosporium* spp., complexe *Rasamsonia argillacea*, rep-PCR, génotypage, écologie



## ABSTRACT

In cystic fibrosis (CF), respiratory infections are the leading cause of morbidity and mortality. Bacteria are the most common causative agents of these infections, but an increasing number of fungal species may also be found, including *Scedosporium* species and species of the *Rasamsonia argillacea* complex. In order to improve our knowledge on the epidemiology of these infections, here we evaluated the interest of PCR amplification of repetitive DNA sequences (rep-PCR) for species identification and strain delineation. rep-PCR was applied to the retrospective analysis of a panel of 63 isolates belonging to the *Scedosporium* genus. Results were consistent with those obtained by beta-tubulin gene sequencing, random amplification of polymorphic DNA and Multilocus Sequence Typing. rep-PCR also permitted precise species identification in the *R. argillacea* complex. Analysis of the data obtained on 116 isolates revealed the capacity of these fungi to chronically colonize the airways of patients with CF, a unique electrophoretic profile being observed usually for each patient. Finally, we produced in this thesis new data about the ecology of *Scedosporium* species by studying different biotopes in Morocco. As previously reported, these fungi are mainly found in human-impacted areas. Also they prefer soils with a neutral pH, a high organic matter content and a very low mineral salts content. In addition, if *S. apiospermum* was by far the predominant species, *S. boydii*, *S. aurantiacum* and *S. dehoogii* were encountered with similar frequencies. In conclusion, data provided here reinforce our knowledge on the epidemiology of the infections caused by these emerging pathogens.

### Key Words

Cystic fibrosis, *Scedosporium* species, *Rasamsonia argillacea* species complex, rep-PCR, genotyping, ecology

# SOMMAIRE

<b>LISTE DES ABREVIATIONS</b> .....	i
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	iii
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	iv
<b>INTRODUCTION</b> .....	1
<b>ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE</b> .....	4
1. La mucoviscidose .....	5
1.1. Le gène de la protéine CFTR .....	6
1.1.1. La protéine CFTR.....	6
1.1.2. Régulation du canal chlore CFTR .....	7
1.1.3. Localisation de la protéine CFTR .....	8
1.1.4. Les mutations du gène <i>CFTR</i> .....	8
1.2. Les manifestations cliniques.....	10
1.2.1. Atteintes génitales .....	11
1.2.2. Atteintes cutanées.....	12
1.2.3. Atteintes digestives .....	12
1.2.4. Atteintes pulmonaires.....	12
a. infections bactériennes.....	14
b. infections virales .....	16
c. infections fongiques .....	17
2. Les <i>Scedosporium</i> .....	18
2.1. Le genre <i>Scedosporium</i> .....	18
2.2. Taxonomie.....	18
2.2.1. Historique .....	18
2.2.2. Taxonomie actuelle .....	19
2.3. Morphologie.....	19
2.3.1. Aspect macroscopique .....	19
2.3.2. Aspect microscopique .....	21
2.4. Pathogénicité.....	22
2.4.1. Infections localisées .....	23
2.4.2. Infections invasives .....	24
2.4.3. Infections pulmonaires .....	25
2.5. Diagnostic et identification .....	26
2.5.1. Examen microscopique direct .....	26
2.5.2. Méthodes culturales .....	26
2.5.3. Identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF .....	27

2.5.4. Méthodes moléculaires .....	28
2.5.5. Sérodiagnostic .....	30
2.6. Ecologie .....	30
3. Complexe d'espèces <i>Rasamsonia argillacea</i> .....	35
3.1. Thermophilie et thermotolérance .....	35
3.2 Taxonomie .....	35
3.2.2. Historique .....	35
3.2.3. Taxonomie actuelle .....	36
3.3. Morphologie .....	36
3.3.1. Caractères cultureux .....	36
3.3.2. Aspect microscopique .....	37
3.4. Pathogénicité .....	38
3.5. Infections à <i>R. argillacea</i> dans la granulomatose septique familiale .....	39
3.6. Diagnostic et identification .....	40
3.7. Sensibilité aux antifongiques .....	40
4. Epidémiologie des infections fongiques au cours de la mucoviscidose .....	42
4.1. Exposition aux champignons filamenteux au cours de la mucoviscidose .....	42
4.2. Examen mycologique des expectorations .....	44
4.3. Génomique des champignons filamenteux dans la mucoviscidose .....	45
4.3.1. Amplification aléatoire d'ADN polymorphique (RAPD) .....	45
4.3.2. Amplification de séquences répétitives palindromiques (rep-PCR) .....	47
4.3.3. Typage par séquençage multi-loci (MLST) .....	47
4.3.4. Analyse de marqueurs microsatellites .....	48
4.3.5. Polymorphisme de longueur des fragments amplifiés (AFLP) .....	49
4.3.6. Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP) .....	49
4.4. Les principaux champignons filamenteux colonisant les voies respiratoires des patients .....	49
4.4.1. Espèces du genre <i>Aspergillus</i> .....	49
4.4.2. Espèces du genre <i>Scedosporium</i> .....	50
4.4.3. Espèces du complexe <i>Rasamsonia argillacea</i> .....	54
<b>TRAVAIL EXPERIMENTAL</b> .....	55
Étude 1 : Identification et génotypage des espèces du complexe <i>Scedosporium apiospermum</i> par analyse des séquences répétitives d'ADN à l'aide du système semi-automatisé DiversiLab® .....	56
Étude 2 : Mise en évidence de la colonisation chronique des voies respiratoires des patients atteints de la mucoviscidose par les espèces du complexe <i>Rasamsonia argillacea</i> .....	78
Étude 3 : Écologie des espèces du genre <i>Scedosporium</i> au Maroc .....	106

<b>DISCUSSION .....</b>	<b>133</b>
<b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>146</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>149</b>

# LISTE DES ABREVIATIONS

---

ABC	<i>Adenosine triphosphate binding cassette</i>
ABPA	Aspergillose broncho-pulmonaire allergique
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNr	ADN ribosomique
ADP	Adenosine diphosphate
AFLP	<i>Amplification fragment length polymorphism</i>
ARN	Acide ribonucléique
ATP	Adenosine triphosphate
BLASTn	<i>Basic Local Alignment Search Tool nucléotide</i>
BT2	Fragment du gène codant la $\beta$ -tubuline
CAL	Fragment du gène codant la calmoduline
CBS	<i>CentraalBureau voor Schimmelcultures</i>
CF	<i>Cystic fibrosis</i>
CFTR	<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>
CGD	<i>Chronic granulomatose disease</i>
DRBC	Dichloran rose bengal chloramphénicol
F508del	Délétion de la phénylalanine en position 508
IHEM	<i>Institute of Hygiene and Epidemiology-Myecology section</i>
ITS	<i>Internal transcribed spacer</i>
LAMP	<i>Loop-mediated isotherm amplification</i>
MALDI-TOF/MS	<i>Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight/mass spectrometry</i>
MBPA	Mycoses broncho-pulmonaires allergiques
MLST	<i>Multilocus sequence typing</i>
MRSA	<i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i>
NBD	<i>Nucleotide binding domain</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NTMs	<i>Nontuberculous mycobacteria</i>

OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PCR-RLB	<i>PCR-based reverse line blot</i>
PKA	<i>Protein kinase A</i>
RAPD	<i>Random amplification of polymorphic DNA</i>
RCA	<i>Rolling-circle amplification</i>
rep-PCR	<i>Repetitive element palindromic-PCR</i>
RFLP	<i>Restriction fragment length polymorphism</i>
RPB2	Fragment du gène codant la seconde grande sous-unité de l'ARN polymerase II
SABD	Sabouraud-dextrose
SNC	Système nerveux central
SOD	Fragment du gène codant la manganèse superoxide dismutase
ST	<i>Sequence type</i>
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TMD	<i>Transmembrane domain</i>
TUB	Fragment du gène codant la $\beta$ -tubuline
UFC	Unité formant colonie
VEMS	Volume expiratoire maximal par seconde
VRS	Virus respiratoire syncytial
YPD	<i>Yeast extract - peptone - dextrose</i>
YPDA	<i>Yeast extract - peptone - dextrose - agar</i>

# LISTE DES FIGURES

---

<b>Figure 1 :</b>	Représentation schématique de la protéine CFTR (Bush <i>et al.</i> , 2015).....	7
<b>Figure 2 :</b>	Modèle de fonctionnement du canal chlore CFTR (Vankeerberghen <i>et al.</i> , 2002) .....	8
<b>Figure 3 :</b>	Les classes de mutations du gène CFTR (Rowe <i>et al.</i> , 2005).....	10
<b>Figure 4 :</b>	Cascade physiopathologique de la mucoviscidose (Bush <i>et al.</i> , 2015).....	14
<b>Figure 5 :</b>	Fréquence d'isolement des bactéries en fonction de l'âge chez les patients atteints de mucoviscidose en France ( <b>A</b> , Bellis <i>et al.</i> , 2016) et au Royaume-Uni ( <b>B</b> , Bush <i>et al.</i> , 2015).....	16
<b>Figure 6 :</b>	Position du genre <i>Scedosporium</i> parmi les <i>Microascaceae</i> (Lackner <i>et al.</i> , 2014a) .....	20
<b>Figure 7 :</b>	Colonies de <i>S. apiospermum</i> après 3 ( <b>A</b> ), 7 ( <b>B</b> ) et 14 ( <b>C</b> ) jours de culture sur milieu YPDA à 37°C. Le verso et gris à noir ( <b>D</b> ) .....	21
<b>Figure 8 :</b>	Morphologie microscopique de <i>S. apiospermum</i> . <b>A</b> : cléistothèces sphériques immatures, aux contours bien délimités ; et <b>B</b> : cléistothèces matures, éclatés lors du montage entre lame et lamelle (x100). <b>C</b> : conidies unicellulaires, brunes, claviformes (x40). <b>D</b> : stade Graphium (x40). .....	22
<b>Figure 9 :</b>	Evolution du nombre de cas rapportés d'infections à <i>S. apiospermum</i> selon la localisation des lésions (Guarro <i>et al.</i> , 2006).....	23
<b>Figure 10 :</b>	Spectres MALDI-TOF de référence pour les espèces du genre <i>Scedosporium</i> et <i>Lomentospora prolificans</i> (Sitterlé <i>et al.</i> , 2014). .....	29
<b>Figure 11 :</b>	Morphologie macroscopique ( <b>A</b> et <b>B</b> ) et microscopique ( <b>C</b> et <b>D</b> ) de <i>R. aegroticola</i> ( <b>A</b> et <b>C</b> ) et <i>R. argillacea</i> ( <b>B</b> et <b>D</b> ) après 7 jours de culture à 37°C sur milieu YPDA. (échelle = 10 µm). .....	37
<b>Figure 12 :</b>	Détection des espèces du complexe <i>R. argillacea</i> par PCR en temps réel (Steinmann <i>et al.</i> , 2014).....	41
<b>Figure 13 :</b>	Proportions relatives des champignons dans l'air et dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose (Kramer <i>et al.</i> , 2015).....	43
<b>Figure 14 :</b>	Profils RAPD des souches de <i>S. apiospermum</i> analysées par Symoens <i>et al.</i> (Symoens <i>et al.</i> , 2006) avec les amorces UBC 701 ( <b>A</b> ) et UBC 703 ( <b>B</b> ). .....	46
<b>Figure 15 :</b>	Schéma de la rep-PCR automatisée et du système DiversiLab (Healy <i>et al.</i> , 2004). .....	47
<b>Figure 16 :</b>	Principe du typage par séquençage multi-loci (MLST) (Klaassen, 2009).....	48
<b>Figure 17 :</b>	Croissance de <i>Scedosporium aurantiacum</i> et <i>Aspergillus fumigatus</i> sur milieux SABD (Sabouraud-dextrose), Mycosel et SceSel+. .....	51

# LISTE DES TABLEAUX

---

<b>Tableau 1</b> : Données épidémiologiques sur la mucoviscidose, d'après Girodon-Boulandet et Costa (Girodon-Boulandet et Costa, 2005) et Monaghan et Feldman (Monaghan et Feldman, 1999).....	6
<b>Tableau 2</b> : Principales manifestations cliniques et leur fréquence au cours de la mucoviscidose (Fiel, 1993).....	11
<b>Tableau 3</b> : Méthodes moléculaires d'identification des espèces du genre <i>Scedosporium</i> (Giraud et Bouchara, 2014). ....	30
<b>Tableau 4</b> : Isolement des espèces du genre <i>Scedosporium</i> à partir de prélèvements environnementaux. ....	32



# **INTRODUCTION**

La mucoviscidose est une maladie génétique évolutive qui affecte de nombreux organes, mais dont le pronostic est dominé par les atteintes de l'appareil respiratoire. Cette maladie s'accompagne d'infections pulmonaires chroniques, à l'origine d'une réaction inflammatoire excessive qui engendre des dommages tissulaires et conduit progressivement à une insuffisance respiratoire. Ces infections sont déterminées par différents microorganismes, bactériens, viraux ou fongiques. Avec la progression de la maladie, les communautés microbiennes, qui constituent le microbiote pulmonaire, font face à une pression thérapeutique et un environnement pulmonaire altéré, ce qui contribue à la raréfaction de certaines espèces et au développement de communautés microbiennes moins diversifiées, composées d'organismes mieux adaptés et résistants au traitement. Ainsi, la colonisation pulmonaire chronique peut évoluer vers des infections liées à ce déséquilibre au sein des communautés microbiennes, et qui représentent la principale cause de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose.

À côté des bactéries qui se situent au premier rang parmi les agents de ces infections, une flore fongique importante a été décrite à partir des expectorations des patients atteints de mucoviscidose, au sein de laquelle les espèces du genre *Scedosporium* et le complexe d'espèces *Rasamsonia argillacea* occupent une position particulière compte tenu des nombreuses questions posées par ces champignons, quant à leur écologie et à l'origine de la contamination des patients, quant aux mécanismes de pathogénicité de ces champignons très rares dans l'air inhalé, ou encore sur les mécanismes de leur résistance intrinsèque aux antifongiques actuels. Le genre *Scedosporium* se situe au deuxième rang parmi les champignons filamenteux colonisant l'arbre bronchique des patients atteints de mucoviscidose. De son côté, *R. argillacea*, un complexe récemment décrit comportant quatre espèces morphologiquement très voisines, est un pathogène émergent dont la prévalence chez les patients atteints de mucoviscidose est encore sous-estimée compte tenu de similitudes morphologiques avec les *Penicillium* et *Paecilomyces*. L'étude de la colonisation des voies respiratoires par ces champignons est primordiale pour comprendre le rôle que ces espèces peuvent jouer dans le processus de la réaction inflammatoire qui est à l'origine de la dégradation progressive de la fonction pulmonaire dans la mucoviscidose. De plus, ces pathogènes sont capables de disséminer chez un hôte immunodéprimé, avec des conséquences graves, et des infections souvent fatales compte tenu de leur faible sensibilité ou résistance intrinsèque aux antifongiques classiques. Dès lors, la prévention est d'un intérêt majeur, et la mise au point de méthodes de typage moléculaire applicables à un grand nombre d'isolats environnementaux et d'isolats cliniques, de même qu'une meilleure connaissance de l'écologie de ces champignons, est nécessaire pour mieux connaître l'épidémiologie des infections qu'ils engendrent au cours de la mucoviscidose, et notamment pour identifier les sources de contamination des patients.

La première partie de ce document présente une synthèse de la bibliographie sur l'état actuel des connaissances sur la mucoviscidose, sur les espèces du genre *Scedosporium* et le complexe d'espèces *R. argillacea*, et sur l'épidémiologie des infections respiratoires fongiques dans la mucoviscidose.

Dans la deuxième partie de ce manuscrit, sont présentés les travaux expérimentaux réalisés au cours de cette thèse. Ces travaux s'organisent autour de deux axes, avec le développement de méthodes d'identification directe et de typage applicables à ces pathogènes, et leur écologie, et se décomposent en trois études: (1) l'évaluation de l'intérêt de l'analyse des séquences répétitives d'ADN, rep-PCR, pour l'identification et le génotypage des espèces du genre *Scedosporium*; (2) l'évaluation de l'intérêt de la rep-PCR pour l'identification directe et le génotypage des espèces du complexe *R. argillacea*; et (3) l'étude de l'écologie et de la distribution des différentes espèces du genre *Scedosporium* dans l'environnement au Maroc.

Ce document se poursuit par une discussion générale des résultats obtenus dans ces études, et une conclusion ouvrant sur les perspectives de recherche générées par ces résultats.

**ANALYSE  
BIBLIOGRAPHIQUE**

### 1. La mucoviscidose

La mucoviscidose, ou fibrose kystique (Cystic Fibrosis), est une maladie génétique héréditaire à transmission autosomique récessive. Elle résulte de mutations du gène *CFTR* (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) qui est localisé sur le chromosome 7. Ce gène code une protéine transmembranaire localisée au pôle apical des cellules épithéliales et impliquée dans les échanges d'électrolytes (chlorures et bicarbonates) au travers de la membrane. Les mutations du gène *CFTR* entraînent un dysfonctionnement de l'ensemble des glandes exocrines, à l'origine de manifestations cliniques diverses (Koch et Høiby, 2000).

La prévalence de la mucoviscidose est relativement plus élevée dans les populations d'origine caucasienne, notamment en Europe, Amérique du Nord et Australasie, avec une incidence estimée à un nouveau-né sur 2500 (Collins, 1992; Vankeerberghen *et al.*, 2002). En France, c'est la maladie génétique autosomique récessive la plus fréquente avec une incidence de 1 naissance sur 4600 (Bellis *et al.*, 2007; Sarles *et al.*, 1999). Cependant, bien que la mucoviscidose ait été étudiée principalement dans les populations caucasiennes, un rapport de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) indique que la maladie est de plus en plus souvent diagnostiquée dans d'autres groupes ethniques en Amérique latine et au Moyen-Orient, ainsi que chez les populations provenant du sous-continent indien qui ont émigré en Europe de l'ouest, ce qui implique la présence de mutations du gène *CFTR* en nombre non négligeable parmi les habitants de cette région d'Asie (Tableau 1) (World Health Organisation, 2002). En Afrique, le statut de la maladie est mal connu en dépit de cas rapportés de mucoviscidose sur ce continent (Touati *et al.*, 2014) et de la mise en évidence de la présence de mutations du gène *CFTR* chez les populations de 12 pays africains (Stewart et Pepper, 2015). Au Maroc, il n'existe pas de registre national de la mucoviscidose et les seuls cas rapportés dans le littérature concernent des individus marocains vivant en Europe (Claustres *et al.*, 2000; Estivill *et al.*, 1997; Merino *et al.*, 2010) et des juifs d'origine marocaine vivant en Israël (Quint *et al.*, 2005). En 2008, une étude a cependant été menée au Maroc sur une collection d'échantillons d'ADN provenant d'individus sains non apparentés ; les résultats ont permis d'estimer la prévalence de la mucoviscidose au Maroc qui serait comprise entre 1/1680 et 1/4150, se rapprochant de celle rapportée dans les populations européennes (Ratbi *et al.*, 2008).

**Tableau 1** : Données épidémiologiques sur la mucoviscidose, d'après Girodon-Boulandet et Costa (Girodon-Boulandet et Costa, 2005) et Monaghan et Feldman (Monaghan et Feldman, 1999).

Population	Incidence à la naissance	Fréquence des hétérozygotes
Caucasiens	1/2500	1/25
Moyen-Orient	1/4400	1/33
Hispaniques	1/8500	1/46
Afro-américains	1/20000	1/70
Asiatique	1/32400	1/90

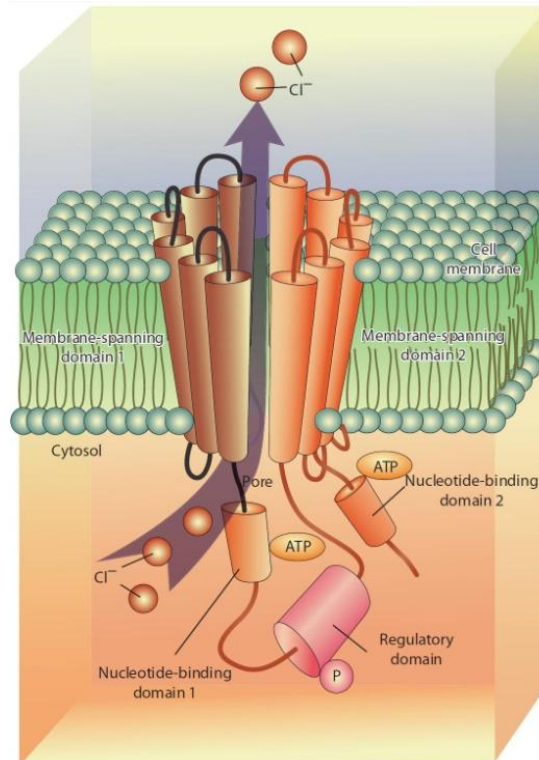
### 1.1. Le gène de la protéine CFTR

En 1936, la mucoviscidose a été décrite pour la première fois par le pédiatre Guido Fanconi sous le nom de « fibrose kystique du pancréas et bronchectasie ». Deux ans après, la maladie est reconnue comme une entité clinique distincte (Andersen, 1938), mais ce n'est qu'en 1953 que le docteur Paul DiSant' Agnese et ses collègues ont découvert des anomalies électrolytiques dans la sueur des malades (augmentation importante de la teneur en chlorure de sodium) (Di Sant'agnese *et al.*, 1953a, 1953b), résultats qui ont permis par la suite le développement d'un test de diagnostic spécifique de la maladie, le test de la sueur (Gibson and Cooke, 1959). En 1983, le défaut de perméabilité aux ions chlore a été décrit au niveau des cellules épithéliales des glandes sudoripares (Quinton, 1983) et au niveau de l'épithélium pulmonaire (Knowles *et al.*, 1983). Le gène impliqué dans la mucoviscidose est isolé en 1989. Il s'agit du gène *CFTR* localisé sur le bras long du chromosome 7 codant un canal chlore transmembranaire. Ce gène de 230 kpb comprend 27 exons. Il est transcrit en un ARN messager de 6,1 kb, codant une protéine transmembranaire ATP-dépendante de 1480 acides aminés et d'une masse moléculaire de 170 kDa (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989; Rommens *et al.*, 1989).

#### 1.1.1. La protéine CFTR

La protéine codée par le gène *CFTR* fait partie de la famille des transporteurs membranaires ATP-dépendants, aussi appelés protéines ABC (ATP-binding cassette). La protéine CFTR (Figure 1) est composée de :

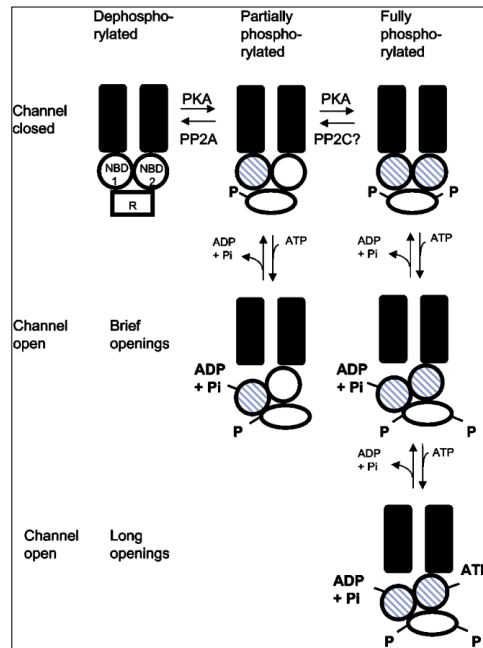
- deux domaines transmembranaires hydrophobes (TMD1 et TMD2) qui interviennent dans la formation du pore et qui sont constitués chacun de six hélices  $\alpha$ ,
- deux domaines de liaison aux nucléotides, NBD1 et NBD2 (ces régions cytoplasmiques hydrophiles sont impliquées dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP pour fournir l'énergie nécessaire au transport des ions),
- et un domaine régulateur (R) caractéristique de la protéine CFTR. Ce domaine est lié au domaine NBD1 et contient des résidus sérine qui sont phosphorylés par les protéines kinase A et C, la phosphorylation du domaine R étant nécessaire pour l'ouverture du canal (Riordan *et al.*, 1989).



**Figure 1** : Représentation schématique de la protéine CFTR, d'après Bush *et al.* (Bush *et al.*, 2015).

### 1.1.2. Régulation du canal chlore CFTR

La protéine CFTR fonctionne comme un canal sélectif pour les anions. La séquence de perméabilité du canal CFTR est :  $\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^- > \text{F}^-$  (Vankeerberghen *et al.*, 2002). La protéine CFTR est localisée à la membrane apicale des cellules épithéliales et son activité est régulée par l'ATP. Plusieurs kinases peuvent activer le canal chlore CFTR, mais seule l'activation par la protéine kinase A (PKA) a été décrite en détail (Figure 2). Dans ce processus, le domaine R est d'abord phosphorylé par la PKA ce qui permet la liaison de l'ATP au domaine NBD1. Quand l'ATP est hydrolysé, le canal s'ouvre et permet la circulation des anions à travers le pore formé par les deux domaines transmembranaires. Lorsque le domaine R est complètement phosphorylé, le second domaine NBD2 peut se lier à l'ATP. Cet événement stabilise le canal chlore à l'état ouvert. Puis, lorsque l'ATP lié à NBD2 est hydrolysé, l'ADP est libéré des deux domaines NBD causant la fermeture du canal. Tant que le domaine R est phosphorylé, les cycles de liaison et d'hydrolyse de l'ATP aux deux domaines NBD peuvent se poursuivre avec pour conséquence, l'ouverture et la fermeture du canal. Enfin, lorsque le domaine R est déphosphorylé par les phosphatases, les domaines NBD ne sont plus en mesure de lier l'ATP et le canal reste fermé en attendant que le domaine R soit à nouveau phosphorylé (Vankeerberghen *et al.*, 2002).



**Figure 2** : Modèle de fonctionnement du canal chlore CFTR, d'après Vankeerberghen *et al.* (Vankeerberghen *et al.*, 2002)

### 1.1.3. Localisation de la protéine CFTR

L'expression de la protéine CFTR a été décrite au niveau des cellules de nombreux épithéliums connus pour leur sécrétion de mucus comme les cellules épithéliales des voies respiratoires, le tractus gastro-intestinal (pancréas, foie et vésicule biliaire), les glandes salivaires et le tractus génital. D'autre part, la protéine CFTR est également exprimée dans les épithéliums dont les cellules ne sécrètent pas de mucus, comme les glandes sudoripares et les reins. En outre, l'expression de la protéine CFTR a été détectée dans des tissus non-épithéliaux tels que le tissu cardiaque, le tissu cérébral, le tissu musculaire lisse, et les lymphocytes (Kreda *et al.*, 2012).

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

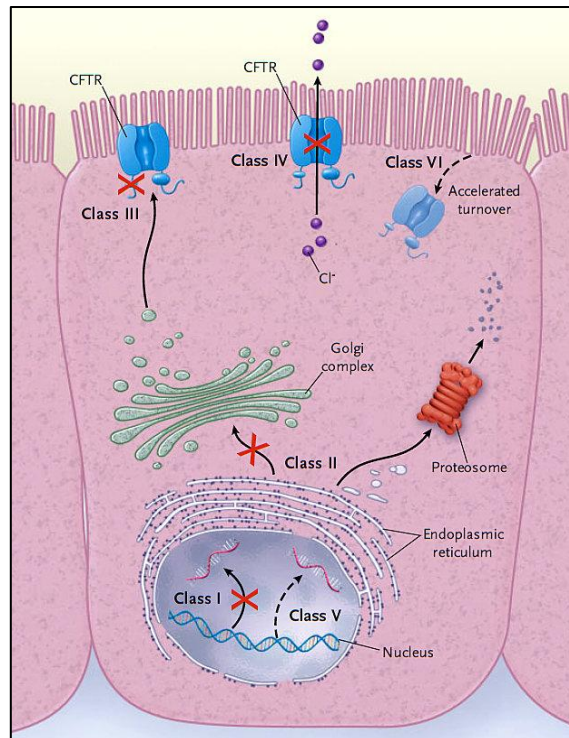
Actuellement, plus de 1900 mutations ont été décrites pour le gène *CFTR* (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). Parmi les mutations étudiées, les mutations les plus communes sont des mutations faux-sens (40%), des mutations de type frame-shift responsables d'un décalage du cadre de lecture (16%) et des mutations altérant les codons essentiels pour l'épissage (12% des mutations) (<http://www.genet.sickkids.on.ca>). La mutation la plus commune est cependant la mutation F508del (ou Phe508del ou  $\Delta$ F508), qui correspond à la délétion de trois paires de bases (CTT) codant un résidu phénylalanine en position 508 sur la protéine CFTR. Cette mutation est en grande partie responsable de la forte incidence de la mucoviscidose dans la population caucasienne, pour laquelle elle représente plus de deux tiers des mutations chez les patients CF (Horsley *et al.*, 2015).



Les mutations du gène *CFTR* peuvent perturber la fonction et la genèse de la protéine CFTR selon différents mécanismes. En fonction de leur nature, et du mécanisme par lequel elles vont provoquer la maladie, ces mutations ont été subdivisées d'abord en quatre classes selon l'anomalie du canal chlore (Welsh et Smith, 1993). Par la suite, deux autres classes ont été proposées pour prendre en compte les défauts associés à certaines mutations (Vankeerberghen *et al.*, 2002) (Figure 3).

- **Classe I** : cette classe regroupe les erreurs de transcription (mutations non-sens ou décalage du cadre de lecture). Dans ces cas, les transcrits sont tronqués et/ou instables et par conséquent la protéine est rapidement dégradée.
- **Classe II** : ces mutations affectent la maturation de la protéine CFTR et son transport vers la membrane des cellules épithéliales. La mutation F508del est un exemple de ce type de mutations.
- **Classe III** : dans ce groupe, l'activité du canal chlore CFTR est affectée, principalement en raison d'altérations dans l'un des domaines NBD. Dans ces cas, la protéine est bien localisée à la membrane apicale des cellules épithéliales, mais elle présente un défaut de régulation. En effet, ces mutations affectent le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP pour l'activation de la protéine CFTR, avec pour conséquence un défaut du contrôle de l'ouverture du canal chlore.
- **Classe IV** : comme pour la classe III, ces mutations affectent l'activité de la protéine CFTR qui est bien présente à la membrane apicale et dont la régulation par l'ATP s'effectue normalement, mais la conductivité et la sélectivité du canal chlore sont défectueuses. En effet, les mutations affectent les acides aminés des régions transmembranaires, localisées à l'intérieur du pore du canal.
- **Classe V** : ces mutations affectent la production de la protéine CFTR suite à des anomalies d'épissage entraînant une diminution des quantités de protéine fonctionnelle.
- **Classe VI** : ces mutations sont responsables d'une diminution de la stabilité de la protéine CFTR (accélération du turnover) et/ou affectent la régulation des autres canaux ioniques par la protéine CFTR.

Il est à noter que certaines mutations affectent le fonctionnement normal de la protéine CFTR de plusieurs façons, et par conséquent, on peut les placer dans plus d'une classe. A titre d'exemple, la mutation F508del (la mutation la plus fréquente du gène *CFTR*) affecte à la fois la maturation (classe II) et la régulation de l'activité du canal chlore (classe III) (Vankeerberghen *et al.*, 2002).



**Figure 3** : Les classes de mutations du gène *CFTR* (Rowe *et al.*, 2005).

## 1.2. Les manifestations cliniques

Dans la mucoviscidose, les atteintes touchent tous les organes disposant de tissus épithéliaux sécréteurs. Selon le rôle physiologique des ces organes, les atteintes peuvent être génitales, cutanées, digestives ou respiratoires (Tableau 2). Les manifestations cliniques de la maladie varient cependant considérablement d'un patient à l'autre, en fonction notamment de la nature des mutations affectant le gène *CFTR*. Certaines malades meurent dans l'enfance alors que d'autres vivent plus de 30 ans ou même 40 ans. De plus, des patients de génotype *CFTR* identique peuvent présenter des différences majeures dans la gravité de la maladie ; ces différences suggèrent l'existence de facteurs génétiques autres que les mutations du gène *CFTR*, mais des facteurs environnementaux tels que la fréquence des infections virales, ou le statut nutritionnel des patients peuvent également influencer la gravité de la maladie (Fiel, 1993).

**Tableau 2 :** Principales manifestations cliniques et leur fréquence au cours de la mucoviscidose (Fiel, 1993).

Organes	Atteintes	Fréquence
<b>Appareil respiratoire</b>		
Voies aériennes supérieures	Polypes nasaux	6-20%
	Pansinusite	90-100%
Tractus respiratoire inférieur	Bronchiolite	100%
	Bronchite	100%
	Bronchectasies	100%
<b>Glandes endocrines</b>		
	Diabète sucré	15%
	Retard pubertaire	85%
<b>Système reproducteur</b>		
	Azoospermie obstructive	98%
	Mucus cervical épais	5%
<b>Tractus gastro-intestinal</b>		
	Insuffisance pancréatique	85%
	Iléus méconial	10%
	Iléus stercoral	10-30%
	Prolapsus rectal	20%
	Invagination intestinale	1%
	Pancréatite	5%
<b>Foie</b>		
	Lithiase biliaire	12%
	Stéatose	20%
	Cirrhose biliaire focale	20%
	Cirrhose multiloculaire	5%

### 1.2.1. Atteintes génitales

La plupart des femmes atteintes de mucoviscidose sont fertiles ou ne montrent qu'une fécondité légèrement réduite en raison de diminution de la teneur en eau de la glaire cervicale, ce qui peut faire obstacle à la pénétration des spermatozoïdes. Par contre, 95% à 98% des hommes atteints de mucoviscidose sont stériles. Cette stérilité est le résultat d'une azoospermie obstructive des canaux déférents (ou spermiductes) qui assurent le transport des spermatozoïdes depuis les testicules jusqu'à la prostate (Fiel, 1993; Vankeerberghen *et al.*, 2002; Welsh et Smith, 1993).

### 1.2.2. Atteintes cutanées

La concentration de la sueur en chlorure de sodium (NaCl) est relativement élevée chez les patients atteints de mucoviscidose suite à la perturbation de la sécrétion/absorption des ions sodium et chlore dans les glandes sudoripares. D'ailleurs cette anomalie est à la base du test de la sueur pour la dépistage de la mucoviscidose (Gibson et Cooke, 1959). En effet, 98% des patients atteints de mucoviscidose sont affectés : ces patients présentent une concentration moyenne en NaCl dans la sueur d'environ 100 mmol/L (les valeurs variant de 60 à 160 mmol/L, alors que ce taux est inférieur à 30 mmol/L chez l'individu sain). Pour les autres patients pour lesquels la concentration en NaCl dans la sueur est inférieure ou égale à 60 mmol/L, le diagnostic de mucoviscidose est bien souvent tardif (Vankeerberghen *et al.*, 2002).

### 1.2.3. Atteintes digestives

Les patients atteints de mucoviscidose présentent souvent des complications digestives, le tractus digestif comprenant en effet plusieurs organes sécréteurs. Ainsi, dans le foie, l'organe sécréteur de la bile, les canaux biliaires peuvent être obstrués par le mucus. Cette obstruction empêche la circulation de la bile et se traduit par une perturbation de la digestion des lipides. Ces complications peuvent être à l'origine d'une cirrhose hépatique chez 1-2% des patients (Vankeerberghen *et al.*, 2002).

Les complications pancréatiques sont plus fréquentes. En effet, 85% des patients atteints de mucoviscidose présentent une insuffisance pancréatique. Dans ce cas, la fonction exocrine du pancréas est perturbée du fait de l'obstruction des canaux pancréatiques par des sécrétions visqueuses et déshydratées. Les enzymes pancréatiques (peptidases, lipases, amylases, ...) ne peuvent plus être déversées dans le duodénum, provoquant ainsi une malabsorption des aliments (protéines, lipides et glucides). D'autre part, la fonction endocrine du pancréas peut être touchée. Les enzymes pancréatiques sont accumulées dans le pancréas et peuvent être à l'origine d'une fibrose par autodigestion. Cette fibrose provoque la survenue d'un diabète insulino-dépendant chez 15% des patients (Vankeerberghen *et al.*, 2002).

Au niveau intestinal, les atteintes se caractérisent par une occlusion intestinale à la naissance des patients. Le méconium déshydraté et riche en protéines et lipides non digérés n'est plus expulsé ce qui provoque un iléus méconial chez 10-15% des nouveau-nés atteints de mucoviscidose (Vankeerberghen *et al.*, 2002).

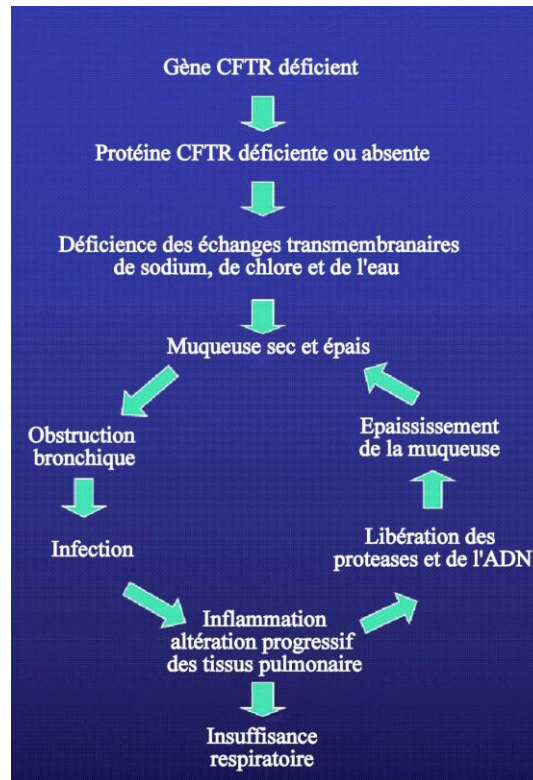
### 1.2.4. Atteintes pulmonaires

L'obstruction des voies respiratoires est le principal facteur de morbidité et de mortalité chez les patients atteints de mucoviscidose (Rowe *et al.*, 2005). La cascade physiopathologique qui conduit de l'anomalie génétique à l'insuffisance respiratoire est résumée sur la figure 4. Chez un individu sain, l'appareil respiratoire est recouvert de mucus fluide dont le rôle est de protéger et d'humidifier les voies respiratoires facilitant ainsi les échanges gazeux entre l'air et le sang circulant ; ce mucus empêche les substances nocives inhalées, comme les poussières et les micro-organismes, d'atteindre les alvéoles

pulmonaires. Ces corps étrangers sont évacués, des bronches vers la gorge, grâce aux mouvements coordonnés des cils vibratiles qui tapissent les cellules épithéliales de l'arbre bronchique, c'est la clairance mucociliaire. La fluidification du mucus est assurée par les échanges ioniques au niveau des cellules de l'épithélium bronchique. Dans la mucoviscidose, l'altération de la protéine CFTR entraîne une perturbation des échanges ioniques (diminution de la sécrétion des ions chlore et augmentation de l'absorption des ions sodium), avec pour conséquence une perturbation de l'équilibre osmotique au pôle apical des cellules épithéliales des voies respiratoires.

Le mucus est donc moins hydraté ; il devient de plus en plus épais et visqueux et s'accumule dans les voies respiratoires ; il en résulte un ralentissement du mouvement des cils vibratiles et les particules inhalées ne sont plus évacuées correctement. L'altération du microenvironnement des voies respiratoires dans la mucoviscidose, caractérisée par l'obstruction et la déshydratation des voies aériennes, l'abaissement de la pression osmotique et du pH du mucus, la diminution de la pression partielle en oxygène et l'augmentation de la pression partielle en dioxyde de carbone, et la forte teneur en protéases extracellulaires et en acides nucléiques, favorise la colonisation des voies respiratoires par les microorganismes à l'origine d'une réaction inflammatoire (Hartl *et al.*, 2012). Bien que la réaction inflammatoire soit en général indispensable pour lutter contre les infections microbiennes et pour restaurer l'intégrité et l'homéostasie des tissus, les mécanismes de réponse pro-inflammatoire activés dans le contexte de mucoviscidose semblent agir d'une manière excessive et déséquilibrée. Cette inflammation, intense et persistante, conduit à des dommages structurels permanents des voies aériennes (bronchectasie) et à une altération progressive de la fonction pulmonaire qui aboutit à l'insuffisance respiratoire et au décès du patient (Cantin *et al.*, 2015).

Les infections respiratoires sont donc très fréquentes au cours de la mucoviscidose et conditionnent la qualité de vie des patients. Ces infections sont déterminées principalement par des bactéries, notamment *Pseudomonas aeruginosa*. De ce fait, de très nombreux travaux ont été réalisés sur ces infections bactériennes durant les quatre dernières décennies, travaux qui ont permis des progrès importants dans le traitement et la prévention de ces infections. Néanmoins, l'augmentation de l'espérance de vie des patients qui en a résulté, s'est accompagnée d'une augmentation de la fréquence des infections respiratoires d'origine virale ou fongique.



**Figure 4** : Cascade physiopathologique de la mucoviscidose (Bush *et al.*, 2015).

## a. infections bactériennes

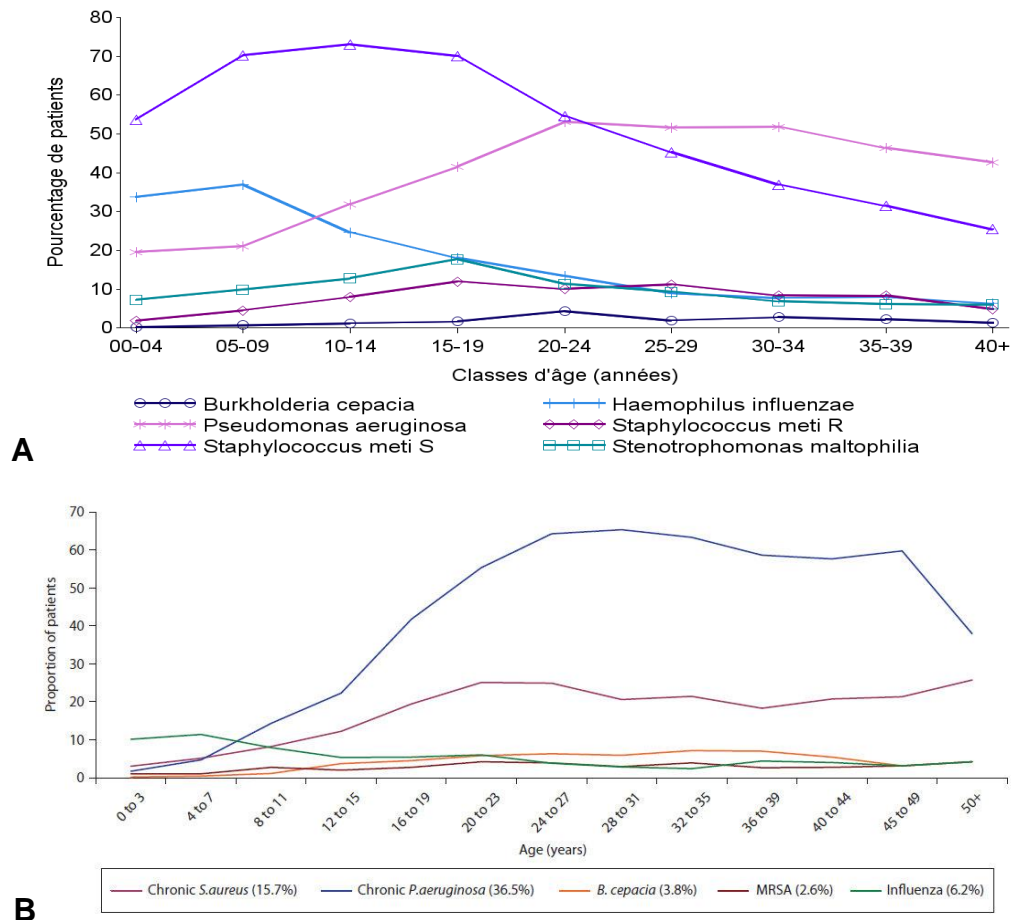
Avec l'inflammation, les infections respiratoires constituent le problème majeur pour les patients atteints de mucoviscidose. En effet, les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose sont colonisées par un microbiome très diversifié, constitué de bactéries, champignons et virus. Ces communautés polymicrobiennes sont en interaction complexe et multifactorielle avec l'hôte. Tout au long de la progression de la maladie, le microbiome pulmonaire est confronté à des cures répétées d'antibiothérapie, aux facteurs immunitaires de l'hôte et à un environnement pulmonaire modifié (y compris une hypoxie, voire une anoxie). Tous ces facteurs contribuent à la sélection de communautés microbiennes moins diversifiées, composées de microorganismes bien adaptés à ce microenvironnement particulier et résistants aux traitements. Ce sont les interactions entre l'inflammation, l'infection et la réponse immunitaire qui rendent l'atteinte pulmonaire aussi complexe dans la mucoviscidose (Filkins et O'Toole, 2015).

Pendant longtemps, seul un nombre limité de microorganismes a été considéré comme impliqué dans les infections broncho-pulmonaires chroniques survenant au cours de la mucoviscidose. Parmi ces microorganismes, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus* sont les agents pathogènes les plus importants, à la fois en terme de fréquence et de gravité, et par conséquent les plus étudiés.

Chez les jeunes enfants, les voies respiratoires sont généralement colonisées par *S. aureus* et *Haemophilus influenzae*. Plus tard dans l'enfance, *P. aeruginosa* prédomine. Son installation dans les voies respiratoires constitue un tournant péjoratif dans l'évolution de la maladie (Bendiak et Ratjen, 2009) (Figure 5). La majorité des antibiotiques inhalés ou

systemiques utilisés au cours de la mucoviscidose sont en fait dirigés contre *P. aeruginosa* et visent à éradiquer cette bactérie. Néanmoins, cette bactérie dispose de capacités d'adaptation très rapide, avec notamment conversion en une forme mucoïde qui est beaucoup plus résistante aux antibiotiques et aux défenses immunitaires de l'hôte, permettant ainsi le passage à la chronicité. Une fois cette forme mucoïde apparue, l'éradication du microorganisme est difficile, voire impossible. Les enfants infectés de manière chronique par *P. aeruginosa* présentent une fonction pulmonaire plus altérée et des taux de survie à 10 ans inférieurs à ceux des enfants non infectés (Horsley *et al.*, 2015).

Récemment, les méthodes non culturales de détection (analyses du microbiome rendues possibles grâce au développement des techniques de séquençage haut débit) ont montré que le microbiome est largement plus complexe, constitué de populations microbiennes très diverses s'équilibrant entre elles habituellement, équilibre qui se rompt lors des phases d'exacerbation. Des bactéries pathogènes émergentes sont de plus en plus souvent détectées, telles que *Stenotrophomonas maltophilia*, *Achromobacter xylosoxidans*, *S. aureus* résistant à la méthicilline (MRSA), les espèces du complexe *Burkholderia cepacia* ou encore des mycobactéries atypiques (non tuberculeuses mycobactéries, NTMs), notamment *Mycobacterium abscessus*. Ces pathogènes sont souvent multi-résistants aux antibiotiques, et donc très difficiles à traiter. Alors que la prévalence (ou au moins le taux de détection) de ces espèces microbiennes augmente dans la plupart des centres de prise en charge de la mucoviscidose, leur pertinence physiopathologique dans l'évolution de l'atteinte pulmonaire reste controversée. Les espèces du complexe *B. cepacia*, de même que les MRSA et les NTMs, sont largement acceptées comme des agents pathogènes dans la mucoviscidose, tandis que le rôle d'autres espèces plus rares (telles que *S. maltophilia*) reste encore débattu (Hector *et al.*, 2016).



**Figure 5** : Fréquence d'isolement des bactéries en fonction de l'âge chez les patients atteints de mucoviscidose en France (A, Bellis *et al.*, 2016) et au Royaume-Uni (B, Bush *et al.*, 2015), d'après Horsley *et al.* (Horsley *et al.*, 2015).

## b. infections virales

A côté des bactéries, les virus sont les premiers microorganismes colonisant le mucus des patients atteints de mucoviscidose. Le virus respiratoire syncytial (VRS) est le virus le plus fréquemment rencontré, suivi des virus influenza A et B. Les virus parainfluenza et les adénovirus ont aussi été signalés dans ce contexte clinique, mais avec des fréquences plus basses. Il faut cependant signaler que ces infections virales surviennent avec la même fréquence chez des individus sains, mais elles sont plus sévères et durent plus longtemps chez les patients atteints de mucoviscidose.

Les virus jouent un rôle important dans la détérioration de la fonction respiratoire, et faciliteraient l'adhésion des bactéries aux tissus des voies respiratoires (LiPuma, 2010; van Ewijk *et al.*, 2005).



### c. infections fongiques

A un stade plus avancé dans l'évolution de la maladie, les voies respiratoires des patients peuvent également être colonisées par des champignons. En effet, les lésions tissulaires épithéliales causées par les infections bactériennes et la réaction inflammatoire qui s'en suit, facilitent l'adhésion des spores fongiques inhalées, et les modifications physico-chimiques du mucus bronchique en font un environnement propice pour la croissance de ces microorganismes. Une importante diversité fongique a été décrite dans les sécrétions respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. *Aspergillus fumigatus* est de loin le champignon filamenteux le plus fréquent dans la mucoviscidose, suivi des espèces du genre *Scedosporium* et à un moindre degré d'*Aspergillus terreus*. Les levures sont également très fréquentes, avec au premier rang d'entre elles *Candida albicans*. D'autres espèces fongiques ont été isolées des sécrétions respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, y compris d'autres espèces aspergillaires comme *Aspergillus flavus*, *Aspergillus nidulans* ou des espèces cryptiques de la section *Fumigati* comme *Aspergillus lentulus* et *Neosartorya pseudofischeri*. Il faut également citer *Exophiala dermatitidis*, *Lomentospora prolificans*, *Rasamsonia argillacea* et *Acrophialophora fuispora* (Pihet *et al.*, 2009).

## 2. Les *Scedosporium*

### 2.1. Le genre *Scedosporium*

Le terme de 'complexe d'espèces' est souvent utilisé pour désigner un groupe d'organismes ou lignages qui sont étroitement liés, voire difficiles à distinguer d'un point de vue taxonomique. En mycologie, l'exemple le plus connu de l'usage de terme 'complexe d'espèces' est le genre *Fusarium*, pour lequel ce terme a été introduit comme alternative aux 'sections' sub-génériques. En effet, les anciennes sections phénotypiques ne concordaient pas avec la phylogénie alors que les complexes d'espèces actuels du genre *Fusarium* sont monophylétiques. En plus des critères taxonomiques, les complexes d'espèces ont également été définis pour des raisons pratiques : différenciation très difficile ou impossible sur des critères purement morphologiques, homogénéité des propriétés physiologiques, ... Howard *et al.* (Howard *et al.*, 2011) ont regroupé les espèces cliniques d'*Aspergillus* section *Nigri* sous le terme de 'complexe *Aspergillus niger*' du fait de l'absence de différences dans les profils de susceptibilité aux antifongiques. D'autre part, l'instabilité de la taxonomie est une raison supplémentaire pour grouper les espèces en 'complexe d'espèces' (Chen *et al.*, 2016).

Le genre *Scedosporium* a connu plusieurs révisions taxonomiques qui ont conduit à de multiples changements de nom pour certaines espèces et à l'introduction de nouvelles espèces. Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2016) reconnaissent l'an dernier six espèces dans le genre *Scedosporium* : *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium boydii*, *Pseudallescheria angusta*, *Scedosporium minutisporum*, *Scedosporium dehoogii* et *Scedosporium aurantiacum*. Dans ce contexte d'instabilité, ces espèces étaient connues sous le terme générique de 'complexe *Scedosporium apiospermum*'. Néanmoins, Chen *et al.* (Chen *et al.*, 2016) restreignent le terme de 'complexe *Scedosporium apiospermum*' aux trois espèces *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium boydii* et *Pseudallescheria angusta*. En effet, les codes-barres génétiques et les profils de sensibilité aux antifongiques des différentes espèces du genre *Scedosporium* ont été comparés. Les résultats montrent que ces trois espèces forment un groupe monophylétique distinct dans le genre *Scedosporium*.

## 2.2. Taxonomie

### 2.2.1. Historique

Les espèces du genre *Scedosporium* sont des champignons filamenteux appartenant à l'embranchement des Ascomycètes, au sous-embranchement des Euascomycètes, à la classe des Sordariomycètes, à l'ordre des Microascales et à la famille des Microascacées. La taxonomie de ces espèces n'a cessé d'évoluer depuis le début du XX<sup>e</sup> siècle quand, en 1911, Saccardo a isolé d'un mycétome à grains blancs, une souche qu'il a décrite sous le nom de *Monosporium apiospermum*. En 1919, cette espèce a été renommée *Scedosporium apiospermum* par Castelli et Chalmers. En 1922, Shear a défini une nouvelle espèce, *Allescheria boydii* isolée d'un mycétome à grains blancs et capable de produire des

cléistothèces. Ces isolats ont été considérés comme des espèces différentes jusqu'en 1944 quand Emmons a rapporté que *S. apiospermum* était l'anamorphe de *P. boydii* (Cortez *et al.*, 2008).

### 2.2.2. Taxonomie actuelle

Ces dernières années, les phylogénies moléculaires basées sur l'analyse des séquences nucléotidiques de différents gènes conservés ont conduit à des changements très importants dans la taxonomie des champignons. Concernant le genre *Scedosporium*, deux révisions majeures de la taxonomie ont été réalisées en 2005 et 2008 (Gilgado *et al.*, 2005; Gilgado *et al.*, 2008). Les travaux réalisés par le groupe de Josep Guarro à Reus (Tarragone, Espagne) ont en effet montré que *S. apiospermum* et *P. boydii* sont en fait deux espèces distinctes, mais très proches à la fois sur un plan morphologique et phylogénétique. Par ailleurs, trois nouvelles espèces ont été décrites : *S. aurantiacum*, *P. minutispora* et *S. dehoogii*.

Lors du XVIII<sup>ème</sup> Congrès International de Botanique à Melbourne en 2011, une révision de l'article 59 du Code International de la Nomenclature Botanique a été acceptée et le principe de 'One fungus - One name' a été adopté. Suite à cette décision, une nouvelle nomenclature a été proposée par le groupe de travail ECMM/ISHAM (European Confederation of Medical Mycology – International Society for Human and Animal Mycology) sur les infections à *Pseudallescheria/Scedosporium*. Seul le nom *Scedosporium* est aujourd'hui accepté ; ainsi les espèces initialement désignées sous le nom de *Pseudallescheria* sont aujourd'hui dénommées *S. boydii* et *S. minutisporum*. Quant à *P. angusta*, le statut de cette espèce restait encore débattu l'an dernier ; il était suggéré qu'il s'agisse d'une espèce intermédiaire entre *S. apiospermum* et *S. boydii* et qu'elle soit le résultat d'un processus continu de spéciation sympatrique. De même, le statut taxonomique de certaines souches de la subdivision *S. boydii*, *Pseudallescheria fusioidea* et *Pseudallescheria ellipsoidea* restait à définir, de même que celui de *Scedosporium deficiens* qui est très proche de *S. dehoogii*. Enfin, il est apparu que l'autre espèce historique du genre *Scedosporium*, *S. prolificans*, était phylogénétiquement très éloignée des autres espèces du genre *Scedosporium*. Elle a donc été réassignée à un autre genre, *Lomentospora* ; on parle aujourd'hui de *Lomentospora prolificans* (Figure 6) (Lackner *et al.*, 2014a, 2014b). Aujourd'hui, 10 espèces sont reconnues dans le genre *Scedosporium*, dont *S. angustum*, *S. fusioideum* et *S. ellipsoideum* (Ramirez-Garcia *et al.*, 2017).

## 2.3. Morphologie

### 2.3.1. Aspect macroscopique

Sur milieu de Sabouraud, les colonies se développent rapidement à 20-25°C. Les espèces du genre *Scedosporium* poussent bien à 37°C et tolèrent même des températures plus élevées (croissance possible à 42°C contrairement à *Lomentospora prolificans*). À 37°C, la croissance est cependant lente (environ 7 jours). Autre particularité des espèces du genre *Scedosporium* face à *L. prolificans*, ces champignons sont résistants au cyloheximide,

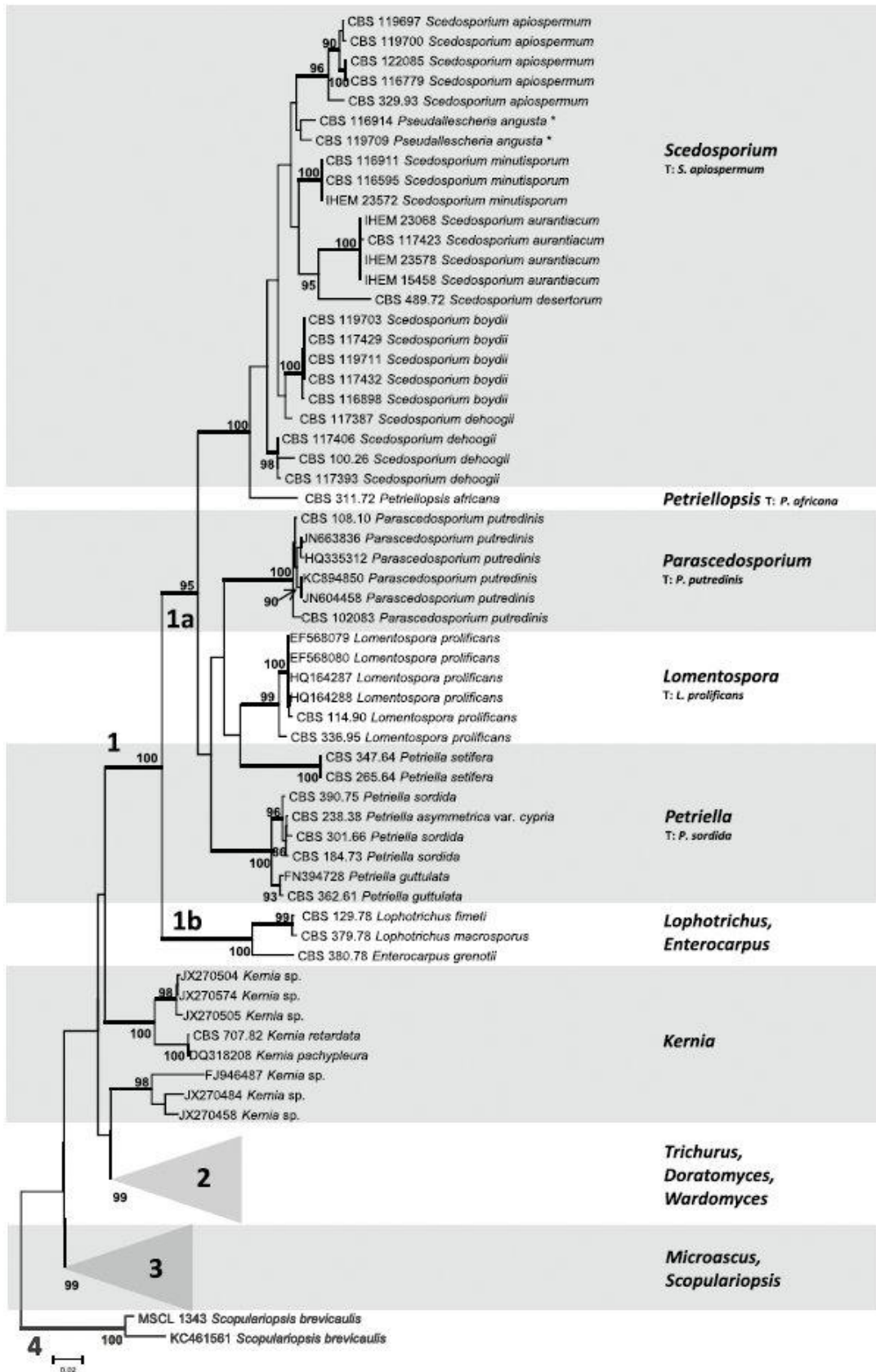
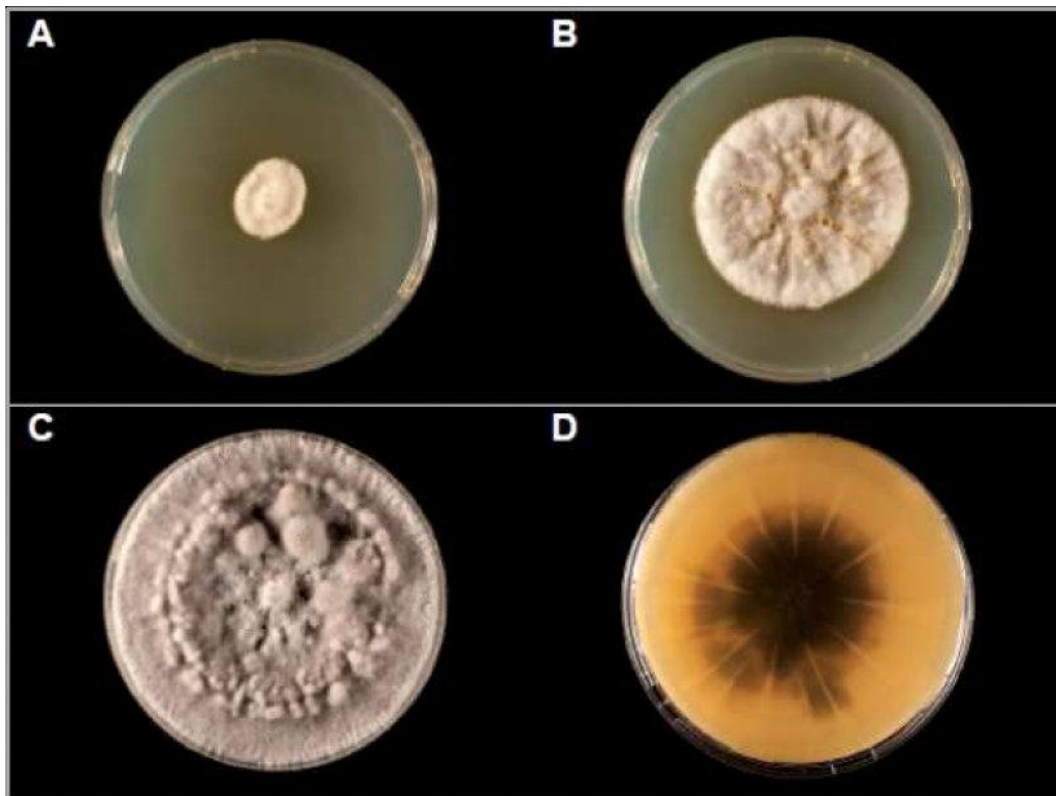


Figure 6 : Position du genre *Scedosporium* parmi les *Microascaceae* (Lackner et al., 2014a).



**Figure 7** : Colonies de *S. apiospermum* après 3 (A), 7 (B) et 14 (C) jours de culture sur milieu YPDA à 37°C. Le verso est gris foncé à noir (D).

propriété utilisée pour la préparation d'un milieu de culture semi-sélectif. Sur gélose de Sabouraud, les colonies ont un aspect cotonneux ou laineux à maturité et une couleur blanchâtre au début, puis deviennent grises en vieillissant. Le verso est gris foncé à noir (Figure 7) (Cortez *et al.*, 2008).

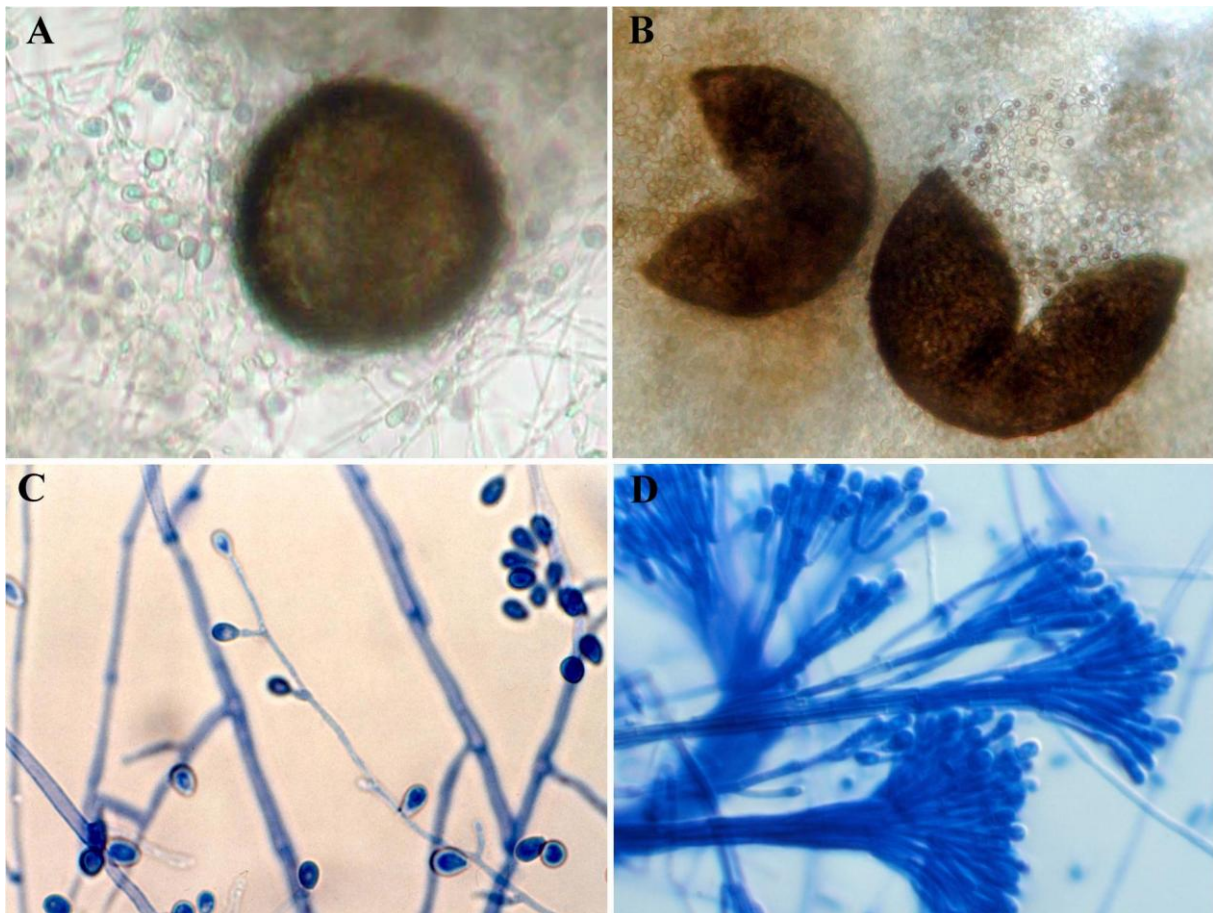
### 2.3.2. Aspect microscopique

Les espèces du complexe *S. apiospermum* sont des champignons filamenteux à thalle septé (constitué de filaments végétatifs cloisonnés, fins et réguliers), hyalin (les filaments sont incolores). Deux modes de reproduction asexuée peuvent être rencontrés. Le stade anamorphe le plus fréquent se caractérise par la production de spores toujours unicellulaires à l'extrémité des filaments végétatifs ou de courtes ramifications articulées à angle aigu sur les filaments végétatifs et présentant un aspect cylindrique. Les spores sont ovoïdes ou claviformes, hyalines à brunes ; elles mesurent 5 à 6  $\mu\text{m}$  de large sur 6 à 14  $\mu\text{m}$  de long (Figure 8C).

Parfois, un stade Graphium peut être observé, caractérisé par la présence de conidiophores groupés en corémies et portant à leur sommet des annellides qui donnent naissance à des conidies hyalines, plus fines et allongées. Les spores sont cylindriques, et mesurent 4 à 7  $\mu\text{m}$  de long sur 5 à 12  $\mu\text{m}$  de large (Figure 8D) (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008).

Enfin une reproduction sexuée est possible. Le téléomorphe se caractérise par la production de cléistothèces sphériques de couleur jaune à brun et de 100 à 300  $\mu\text{m}$  de diamètre. Ces organes se forment à la périphérie des colonies, en particulier sur des milieux de culture pauvres à base de farine de maïs (Corn meal agar) ou tels que la gélose pomme de terre-dextrose-agar (PDA), la gélose PCA (pomme de terre-carotte agar) ou encore le milieu de Takashio (gélose de Sabouraud diluée) (Figure 8A et 8B).

À maturité, ces organes complètement clos se déchirent pour libérer des ascques sphériques octosporés dont la paroi est si fine que très rapidement les ascospores sont libérées. Les ascospores sont unicellulaires, ovoïdes à ellipsoïdales et lisses, de couleur jaune pâle à brun cuivre ; elles mesurent 6 à 10  $\mu\text{m}$  de long sur 4 à 9  $\mu\text{m}$  de large.

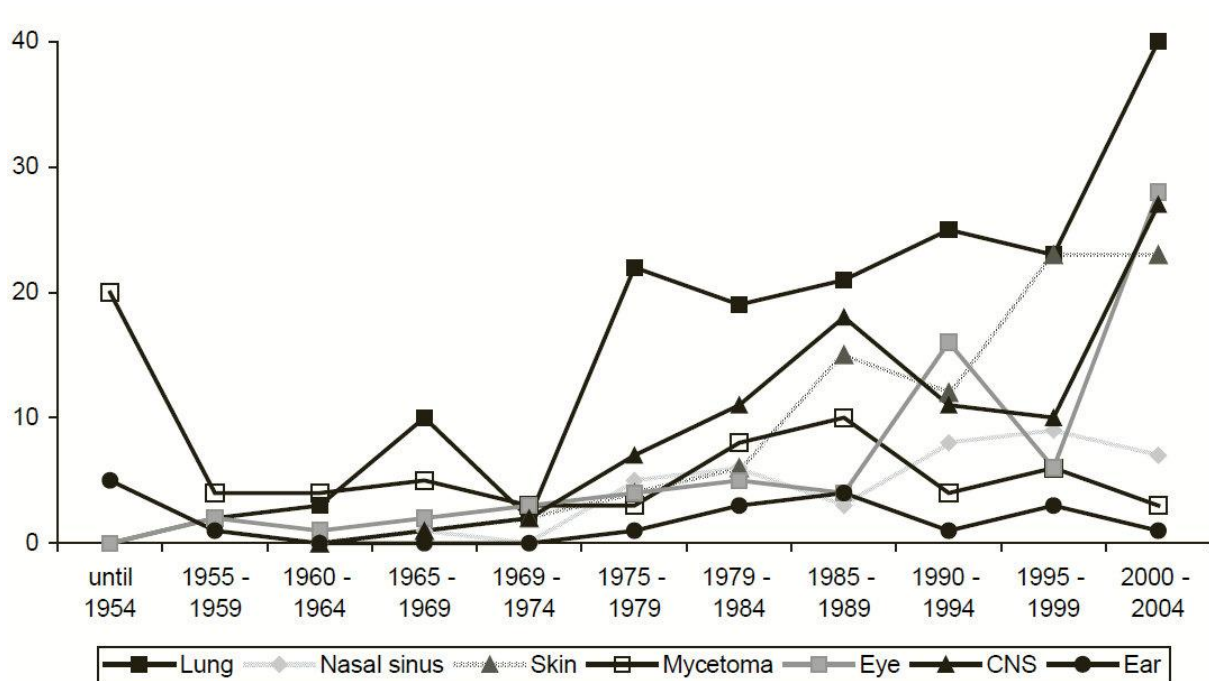


**Figure 8** : Morphologie microscopique de *S. apiospermum*. **A** : cléistothèces sphériques immatures, aux contours bien délimités ; et **B** : cléistothèces matures, éclatés lors du montage entre lame et lamelle (objectif x100 ; photos : Dr. F. Symoens). **C** : conidies unicellulaires, brunes, claviformes (objectif x40). **D** : stade Graphium (objectif x40).

### 2.4. Pathogénicité

Les espèces du genre *Scedosporium* (surtout *S. apiospermum*, *S. boydii* et *S. aurantiacum*) sont des pathogènes opportunistes avec une très faible sensibilité intrinsèque aux antifongiques actuels. Initialement, ces champignons étaient connus pour être impliqués principalement dans des infections localisées consécutives à des traumatismes et dans des

infections respiratoires telles que des sinusites et des mycétomes pulmonaires sur terrain de tuberculose, mais de nouvelles manifestations cliniques sont apparues ces dernières années (Figure 9). Ces champignons peuvent en effet déterminer des infections graves chez des individus immunodéprimés, mais aussi chez des individus immunocompétents dans certaines circonstances (Guarro *et al.*, 2006).



**Figure 9 :** Evolution du nombre de cas rapportés d'infections à *S. apiospermum* selon la localisation des lésions (Guarro *et al.*, 2006).

### 2.4.1. Infections localisées

Les espèces du genre *Scedosporium* sont des agents classiques de mycétome, une infection chronique des tissus cutanés et sous-cutanés pouvant s'étendre par contiguïté aux articulations, à l'origine d'arthrites au niveau des genoux ou des coudes par exemple. Ces atteintes sous-cutanées peuvent parfois évoluer vers une destruction locale du tissu osseux sous-jacent, c'est l'ostéomyélite. D'autre part, une infection accidentelle de l'œil (par l'intrusion d'un corps étranger ou après une chirurgie oculaire) est possible, à type de kératite, de rétinite ou d'endophtalmie (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008; Jimenez et Salvo, 2011).

Les mycétomes sont plus fréquents chez les hommes de 20 à 40 ans, probablement en raison d'une plus forte exposition à ces agents pathogènes du fait de la pratique du jardinage par exemple et d'un risque accru de blessure tellurique (Fahal, 2004). D'autre part, 70 à 80% des mycétomes sont localisés au niveau des pieds ce qui s'explique aussi par l'habitat tellurique de ces champignons (Jimenez et Salvo, 2011).

On distingue deux types de mycétomes selon leur étiologie : les mycétomes actinomycosiques sont causés par des Actinomycètes alors que les eumycétomes sont provoqués par des champignons filamenteux. Les mycétomes fongiques sont déterminés principalement par un dématié, *Madurella mycetomatis* qui est responsable de 70% des cas rapportés ; ce champignon n'est cependant rencontré que dans les régions tropicales, notamment en Inde, au Soudan et à Madagascar. Les espèces du genre *Scedosporium* représentent les agents les plus répandus de mycétomes fongiques dans les zones tempérées, notamment en Europe et aux Etats-Unis où elles sont les seuls champignons en cause dans les mycétomes autochtones (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008; Jimenez et Salvo, 2011); *S. apiospermum* est ainsi responsable de 10% de l'ensemble des cas de mycétome fongique. Contrairement à *M. mycetomatis* qui est responsable de mycétome à grains noirs, *S. apiospermum* engendre des mycétomes à grains blancs, les filaments végétatifs étant incolores, hyalins.

Le traitement des mycétomes consiste en l'ablation chirurgicale de la masse (ou le drainage du pus), associée à la prise d'antifongiques, itraconazole par exemple (Jimenez et Salvo, 2011).

### 2.4.2. Infections invasives

Des infections localisées à *S. apiospermum* peuvent conduire à des infections disséminées. Dans la majorité des infections invasives à *S. apiospermum*, le tractus respiratoire est la porte d'entrée la plus probable. Cependant, d'autres portes d'entrée sont parfois rapportées, telles que l'inoculation traumatique d'éléments fongiques à partir du sol par piqure végétale ou à la suite d'une blessure ou d'un accident de la circulation. Ces infections invasives peuvent aussi être la conséquence d'une sinusite, de l'utilisation de cathéters veineux centraux, de la pose de prothèses, d'une intervention chirurgicale ou encore de lésions ulcéreuses des intestins (Cortez *et al.*, 2008; Lackner et Guarro, 2013). Le statut immunitaire du patient affecte la gravité des scédosporioses disséminées. Ces infections sont observées majoritairement chez des individus fortement immunodéprimés, plus occasionnellement chez des victimes de presque-nyade (suite à l'inhalation d'eau stagnante et ainsi d'éléments fongiques).

Le spectre clinique des scédosporioses profondes est large, allant de formes purement pulmonaires à des atteintes disséminées par voie sanguine ou lymphatique. Une atteinte du système nerveux central (SNC), souvent fatale, est possible dans ces formes disséminées, notamment chez le transplanté pulmonaire, mais aussi chez des individus immunocompétents lors du syndrome de presque-nyade (Lackner et Guarro, 2013).

Le syndrome de presque-nyade est un processus d'insuffisance respiratoire primaire causé par l'immersion de la victime dans une eau polluée (Idris *et al.*, 2003). Les atteintes cérébrales du syndrome de presque-nyade sont déterminées principalement par les espèces du genre *Scedosporium* (Cortez *et al.*, 2008). Les manifestations cliniques sont multiples, avec des nausées et des vomissements, une raideur de la nuque, des douleurs dorsales, des maux de tête, une photophobie, des vertiges, une paralysie faciale, une faiblesse dans les bras et les jambes, et des troubles mentaux (convulsions) (Lackner et



Guarro, 2013). Un infarctus cérébral est possible, de même qu'une hydrocéphalie. Entre 1956 et 2006, 23 cas d'infections à *S. apiospermum* suite à une presque-noyade ont été rapportés dont 21 cas de scédosporiose cérébrale (avec présence d'un ou plusieurs abcès dans le parenchyme cérébral) (Katragkou *et al.*, 2007). *Scedosporium apiospermum* présente une affinité particulière pour le système nerveux central. Cette affinité serait à la dépendance du champignon pour le fer et à la présence de fer libre dans le SNC alors qu'il est liée à la transferrine dans le plasma, et donc moins facilement utilisable (Buzina *et al.*, 2006).

99 cas d'atteintes du SNC par *S. apiospermum* ont été analysés par Kantarcioglu *et al.* (Kantarcioglu *et al.*, 2008), diagnostiqués entre 1948 et 2007. La proportion de patients immunocompétents (44%) était légèrement inférieure à celle des patients immunodéprimés (56%). Les manifestations cliniques les plus fréquentes étaient des abcès cérébraux (69%), suivis par des co-infections du tissu cérébral et/ou de la moelle épinière et des méninges (10%) et enfin des méningites (9%). Le taux de mortalité était très élevé, de 74%.

### 2.4.3. Infections pulmonaires

Bien que les champignons du genre *Scedosporium* n'aient été qu'exceptionnellement décrits dans les enquêtes aéromycologiques, les scédosporioses pulmonaires résultent vraisemblablement de l'inhalation de spores aéroportées. Après inhalation, les spores fongiques sont habituellement éliminées via la clairance muco-ciliaire ou la phagocytose par les macrophages alvéolaires. En cas de déficience de la clairance muco-ciliaire, les spores stagnent dans les voies respiratoires où elles vont germer, et l'intervention des cellules phagocytaires est alors nécessaire pour contrôler l'infection. Les scédosporioses pulmonaires ou broncho-pulmonaires nécessitent un déficit grave de la clairance muco-ciliaire, par exemple lors de bronchectasies, d'une broncho-pneumopathie chronique obstructive, d'une mucoviscidose, d'une sarcoïdose ou d'une tuberculose (Cortez *et al.*, 2008). Une revue de la littérature réalisée en 2012 a analysé les 189 cas de scédosporiose pulmonaire rapportés entre 1955 et 2010. Les manifestations cliniques les plus fréquentes étaient la pneumonie pour 89 cas, suivie par la balle fongique pour 46 cas et l'abcès pulmonaire pour 18 cas (Kantarcioglu *et al.*, 2012).

Les balles fongiques surviennent chez des patients présentant une sarcoïdose ou une tuberculose, mais parfois chez des individus apparemment en bonne santé. Elles se caractérisent par le développement du champignon dans une cavité préexistante ou dans une bronche dilatée, sous forme de filaments mycéliens agglomérés entre eux et liés à du mucus et des débris cellulaires (Guarro *et al.*, 2006). Le traitement de cette infection repose sur l'exérèse chirurgicale (Severo *et al.*, 2004).

Des manifestations immuno-allergiques sont également possibles, notamment des mycoses broncho-pulmonaires allergiques comparables à l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique ou ABPA. Bien qu'*Aspergillus fumigatus* soit le principal agent des mycoses broncho-pulmonaires allergiques, d'autres espèces fongiques ont également été rapportées dans ce contexte, notamment d'autres espèces du genre *Aspergillus*, mais aussi des levures

comme *Candida albicans* et *Candida glabrata*, ou d'autres filamenteux tels que des *Mucor*, des dématiés (*Curvularia lunata*, *Helminthosporium* sp., *Bipolaris* sp., *Stemphylium* sp.) et des *Penicillium* (Miller *et al.*, 1993). Outre ces champignons, Rippon et Carmichael (Rippon et Carmichael, 1976) ont décrit en 1976 un premier cas de scédosporiose broncho-pulmonaire allergique. Par la suite, d'autres cas ont été décrits impliquant *S. apiospermum* dans ce type de mycoses (Lake *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1993; Cimon *et al.*, 2000; Kramer *et al.*, 2015). La colonisation des voies respiratoires peut déclencher une réaction inflammatoire conduisant à des désordres broncho-pulmonaires allergiques (Cimon *et al.*, 2000). La maladie est caractérisée par la présence dans les expectorations de bouchons muqueux contenant des filaments de *Scedosporium*. Sur un plan clinique, on observe un asthme, avec présence d'infiltrats à la radiographie pulmonaire, et sur le plan biologique une hyperéosinophilie, une élévation du taux d'IgE totales dans le sérum, la présence de précipitines et lorsque l'allergène est disponible commercialement, une réactivité cutanée immédiate pour l'agent étiologique (Guarro *et al.*, 2006).

## 2.5. Diagnostic et identification

Le diagnostic des infections dues aux *Scedosporium* repose sur la mise en évidence du champignon par l'examen microscopique direct du prélèvement ou l'examen histopathologique d'un prélèvement biopsique, associé à l'isolement du champignon par culture. Les méthodes moléculaires doivent être utilisées seulement comme examens complémentaires aux tests classiques (Tortorano *et al.*, 2014).

### 2.5.1. Examen microscopique direct

L'examen microscopique montre, en cas de positivité, la présence de filaments mycéliens septés, fins et réguliers. La différenciation d'avec d'autres hyphomycètes hyalins, notamment les *Aspergillus*, est impossible sur le seul aspect des filaments mycéliens. Thornton *et al.* (Thornton *et al.*, 2009) ont développé une méthode immunohistologique pour la détection des espèces du genre *Scedosporium*. Cette technique est basée sur l'utilisation de deux anticorps monoclonaux reconnaissant un épitope glucidique présent dans la paroi des spores et des hyphes. Ces anticorps sont spécifiques des trois espèces majeures du genre, à savoir *S. apiospermum*, *S. boydii* et *S. aurantiacum*.

Dans les mycétomes à *Scedosporium*, l'aspect à l'examen direct est différent puisque le développement du champignon dans les tissus s'effectue sous forme de grains fongiques, de couleur blanchâtre compte tenu de l'absence de mélanine dans la paroi des filaments mycéliens (d'où le terme de mycétome à grains blancs). Les grains sont lisses et relativement larges (1 à 2 mm). Sur coupes histologiques, ils sont habituellement entourés d'un substrat éosinophile, caractéristique des mycétomes à *Scedosporium* (Hay et Mackenzie, 1982).

### 2.5.2. Méthodes culturales

L'efficacité des méthodes culturales pour détecter les espèces du complexe *S. apiospermum* dépend de plusieurs facteurs, à savoir la méthode de traitement des

échantillons, le milieu de culture utilisé, et la température et la durée de l'incubation. Les espèces du genre *Scedosporium* peuvent croître sur des milieux de culture conventionnels utilisés en microbiologie (gélose au sang ou gélose chocolat). Néanmoins, leur présence peut être masquée par la croissance beaucoup plus rapide des bactéries pour les prélèvements polymicrobiens comme les prélèvements respiratoires ou cutanés. L'addition d'antibiotiques permet ainsi de faciliter leur détection. Le milieu de culture le plus utilisé est la gélose de Sabouraud ou la gélose YPDA (yeast extract-peptone-dextrose-agar) additionnée d'antibiotiques, tels que le chloramphénicol ou une association de chloramphénicol et gentamicine. Néanmoins, pour les prélèvements respiratoires, l'utilisation de milieux de culture semi-sélectifs est fortement recommandée pour la détection des *Scedosporium*; en effet, ces champignons à croissance lente sont souvent associés à d'autres espèces fongiques, notamment *A. fumigatus* qui présente une croissance rapide et extensive pouvant masquer la présence de ces champignons (Borman *et al.*, 2010; Giraud et Bouchara, 2014).

Ces milieux de culture semi-sélectifs sont basés sur les particularités physiologiques ou biochimiques de ces champignons, notamment leur résistance au cycloheximide, un antibiotique antifongique inhibant la croissance de nombreux champignons filamenteux comme les *Aspergillus* et les Mucorales. Ainsi, la gélose YPDA additionnée de cycloheximide a prouvé son efficacité pour la détection sélective des espèces du genre *Scedosporium* (Cimon *et al.*, 2000). D'autres milieux de culture, non commercialisés, sont plus efficaces encore, comme la gélose au dichloran - rose Bengale - chloramphénicol additionnée de bénomyl, un inhibiteur de la polymérisation de la tubuline chez les *Aspergillus* notamment (DRBC-bénomyl) ou le milieu Sce-Sel+ qui contient lui aussi du dichloran et du bénomyl (Rainer *et al.*, 2007a).

Plus récemment, la capacité de *S. apiospermum* à assimiler différentes sources de carbone et d'azote a permis le développement d'un milieu de culture hautement sélectif, le milieu Scedo-Select III. Le principe de ce milieu de culture repose sur la capacité des espèces du genre *Scedosporium* à utiliser le 4-hydroxybenzoate comme seule source de carbone et d'énergie. La sélectivité est renforcée par l'utilisation de sulfate d'ammonium comme source d'azote et l'incorporation de dichloran et de bénomyl (Pham *et al.*, 2015).

Ces trois milieux de culture semi-sélectifs ont prouvé leur efficacité pour la détection des *Scedosporium* dans des échantillons cliniques pour la gélose YPDA-cycloheximide (Cimon *et al.*, 2000; Borman *et al.*, 2010;) et la gélose Sce-Sel+ (Rainer *et al.*, 2007b; Sedlacek *et al.*, 2015) ou environnementaux pour les milieux Sce-Sel+ (Kaltseis *et al.*, 2009) et Scedo-Select III (Rougeron *et al.*, 2014; Luplertlop *et al.*, 2016).

### 2.5.3. Identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF

L'identification repose classiquement sur l'examen macroscopique et microscopique des colonies, mais cet examen tend à être supplanté par la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF.

La spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (pour Matrix Assisted LASER Desorption Ionisation-Time of Flight) est une technique rapide, précise et simple pour l'identification des microorganismes à partir de cultures. Cette technologie génère des

empreintes spectrales caractéristiques et spécifiques pour chaque microorganisme, ce qui permet l'identification précise des microorganismes (Croxatto *et al.*, 2012).

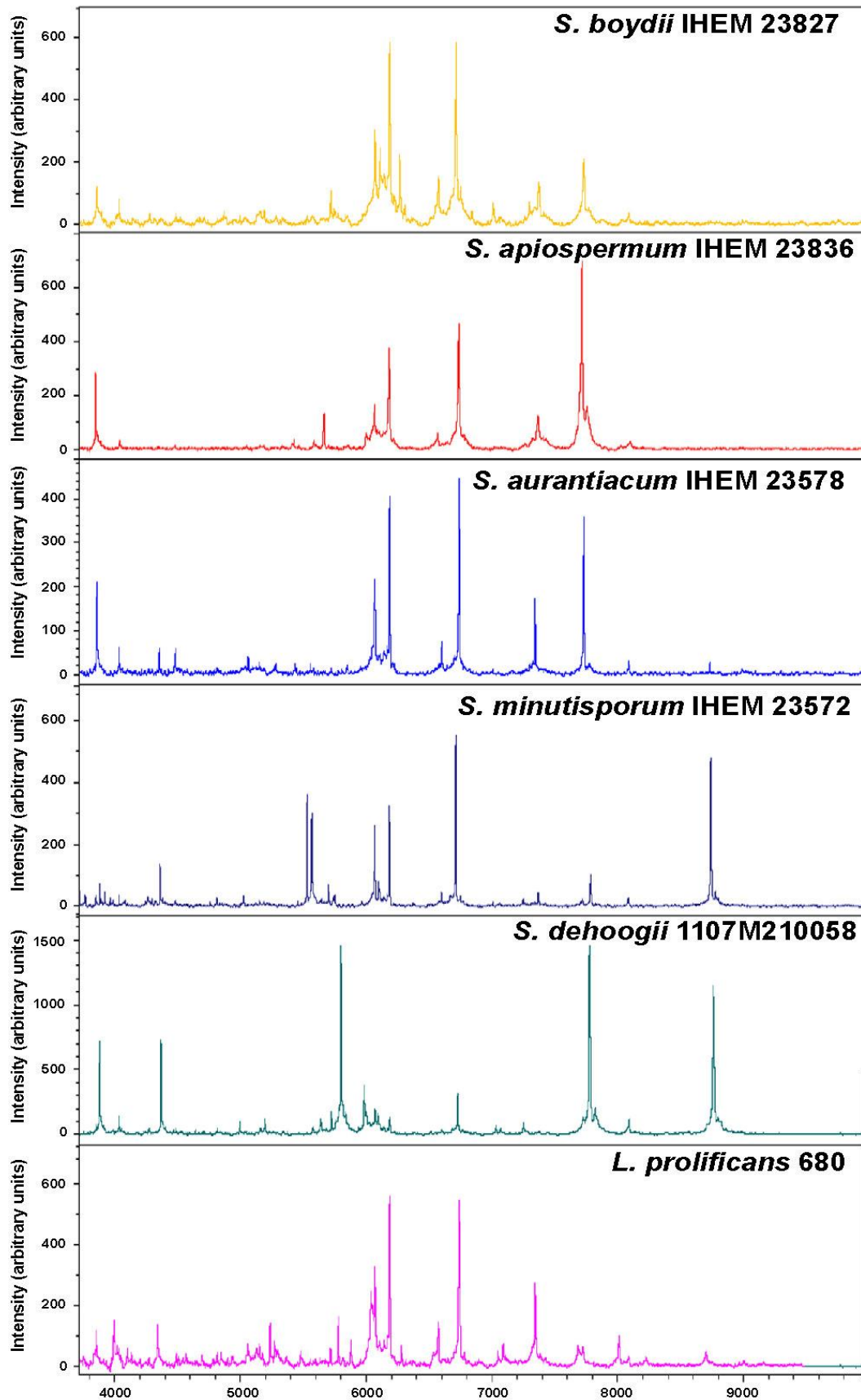
La technologie MALDI-TOF repose sur un spectromètre de type MALDI et un analyseur de temps de vol (TOF). L'échantillon biologique est d'abord mélangé à une matrice composée de petites molécules acides (peptides, protéines, hydrates de carbone) pour favoriser l'ionisation des composés. Le mélange matrice-échantillon est ensuite déposé sur une surface métallique, puis il est placé dans le spectromètre et chaque dépôt est alors soumis à 1000 tirs aléatoires du LASER, la matrice absorbe l'énergie de ces tirs et l'utilise pour la désorption des biomolécules qui sont vaporisées et ionisées. Les ions formés sont accélérés par un champ électrostatique et pénètrent dans le tube de vol. Le temps de vol, ou durée nécessaire pour atteindre le détecteur, est proportionnel à la masse ( $m$ ) de l'ion et inversement proportionnel à sa charge ( $z$ ). Plus un ion sera lourd, c'est-à-dire plus son rapport  $m/z$  sera élevé, plus il atteindra lentement le détecteur. L'interface informatique de la technologie convertit le signal correspondant aux ions impactés en grandeurs électriques, représentées par des pics sur un graphique. L'ensemble des pics obtenus forme le spectre de l'échantillon. Ce dernier est comparé à une base de données qui permet l'identification du microorganisme au rang de genre ou d'espèce (Desoubeaux *et al.*, 2010).

La technologie MALDI-TOF est de plus en plus utilisée pour l'identification des espèces de bactéries et de levures. De plus, des études récentes ont rapporté l'efficacité de la spectrométrie de masse MALDI-TOF pour l'identification rapide des champignons filamenteux (De Carolis *et al.*, 2012; Santos *et al.*, 2010). Récemment, Sitterlé *et al.* (Sitterlé *et al.*, 2014) ont développé une base de données spécifique des espèces du genre *Scedosporium* (Figure 10), base qui a été utilisée pour l'identification précise de 251 d'isolats environnementaux de *Scedosporium* et validée par comparaison avec les résultats de séquençage du gène de la beta-tubuline (Rougeron *et al.*, 2014).

### 2.5.4. Méthodes moléculaires

Plusieurs méthodes d'identification moléculaire basées sur l'amplification de l'ADN par PCR ont été développées (Tableau 3). Compte tenu des différences de sensibilité aux antifongiques d'une espèce à l'autre dans le genre *Scedosporium*, ces méthodes peuvent être utilisées en routine clinique en plus des méthodes conventionnelles pour une détection rapide de ces espèces (Giraud et Bouchara, 2014).

Parmi les méthodes non culturales, la détection de métabolites spécifiques sécrétés par les champignons peut être une alternative pour la détection des pathogènes fongiques. L'acide dimérumique et le  $N^{\alpha}$ -méthyl coprogène B sont deux sidérophores (des molécules chélatrices de fer) sécrétés par les *Scedosporium*. Le  $N^{\alpha}$ -méthyl coprogène B est produit spécifiquement par ces champignons et peut constituer un marqueur diagnostique d'une colonisation des patients atteints de mucoviscidose (Bertrand *et al.*, 2010).



**Figure 10** : Spectres MALDI-TOF de référence pour les espèces du genre *Scedosporium* et *Lomentospora prolificans* (Sitterlé *et al.*, 2014).

**Tableau 3** : Méthodes moléculaires d'identification des espèces du genre *Scedosporium* (Giraud et Bouchara, 2014).

Techniques	Matériel utilisé	Cible
Séquençage	Colonies fongiques	Séquence des régions ITS 1 et 2* ou du gène de la tubuline (BT2)
PCR-RLB (PCR-based reverse line blot)	Colonies fongiques et crachats	Séquence BT2
Amplification isotherme facilitée par boucle (LAMP)	Colonies fongiques	Séquence BT2
Amplification par cercle roulant (RCA)	Colonies fongiques	Séquences ITS
Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (RFLP)	Colonies fongiques	Séquences ITS
Polymorphisme de longueur des fragments d'amplification (AFLP)	Colonies fongiques	Séquence BT2

\* Régions ITS (*Internal Transcribed Spacer*) 1 et 2 des ADN ribosomiaux.

### 2.5.5. Sérodiagnostic

Cimon *et al.* (Cimon *et al.*, 2000) ont développé une technique de contre-immunoélectrophorèse pour la sérodiagnostic des infections causées par les espèces du genre *Scedosporium*. Cependant, la possibilité d'une réaction croisée avec des antigènes aspergillaires constitue une des limites majeures de cette technique. Un autre antigène a été isolé par Pinto et collaborateurs (Pinto *et al.*, 2001) qui serait plus spécifique. Néanmoins, pour cet antigène polysaccharidique, une faible réaction croisée avec des antigènes de *Sporothrix schenckii* a été observée.

### 2.6. Ecologie

Les espèces du genre *Scedosporium* sont des champignons filamenteux saprophytes, qui semblent être ubiquistes dans les zones tempérées, mais leur habitat naturel est inconnu (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008). En effet, la présence de ces champignons dans l'environnement est souvent liée aux activités humaines. Ces espèces sont thermotolérantes et peuvent tolérer des pressions partielles en oxygène faibles et des teneurs salines élevées (5%) (Dzawachiszwilli *et al.*, 1964; de Hoog *et al.*, 1994). De ce fait *S. apiospermum* peut survivre, et même croître, dans des environnements pollués avec une faible aération et des pressions osmotiques élevées (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008).

L'isolement de ces champignons à partir de prélèvements environnementaux a été rapporté très tôt lors d'investigations environnementales sur les champignons pathogènes. Ainsi, au début des années cinquante, *S. apiospermum* a été isolé pour la première fois à partir d'échantillons de terre aux Etats Unis d'Amérique (Ajello and Zeidberg, 1951; Ajello, 1952; Emmons, 1954; Ajello, 1956), puis au Canada où il été trouvé dans des échantillons d'eau polluée et dans les boues de stations d'épuration des eaux usées (Cooke et Kabler, 1955). Depuis, plusieurs études ont révélé la présence de *S. apiospermum* dans l'environnement, souvent dans des milieux riches en nutriments, tels que les milieux riches en matière organique en dégradation (débris végétaux, fumiers), les terrains fréquentés par les animaux, les excréments des animaux, les eaux stagnantes, les eaux usées et les boues de stations d'épuration des eaux usées (Tableau 4).

*Scedosporium apiospermum* est présent aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations. Ainsi, *S. apiospermum* était l'espèce fongique la plus abondante dans des échantillons de terre de plantes en pot dans un hôpital au Canada (Summerbell *et al.*, 1989). De même, une étude a été menée au domicile de patients atteints de mucoviscidose et colonisés par *S. apiospermum*. Tous les prélèvements d'air (n = 18) et d'eau (n = 9) se sont révélés négatifs en culture pour *S. apiospermum*. Un seul prélèvement de surface (n = 52) a révélé la présence de ce champignon. En revanche, 72% des prélèvements de terre des plantes en pot (41/57) étaient positifs pour *S. apiospermum* (Sidot *et al.*, 2007).

*Scedosporium apiospermum* est particulièrement abondant dans des environnements pollués comme les eaux usées, les espaces verts au milieu urbain et les sols contaminés par des hydrocarbures. Dans ce contexte, vers la fin des années quatre-vingt-dix, April *et al.* (April *et al.*, 1998, 1999) ont isolé *S. apiospermum* à partir d'échantillons de terre riches en hydrocarbures (sols imbibés d'huile et sols des fosses à combustion de résidus pétroliers). Dans ces études, la capacité de biodégradation des hydrocarbures par *S. apiospermum* a été révélée après inoculation des isolats sur des géloses supplémentées en pétrole brut. En outre, la capacité de croissance de *S. apiospermum* a été étudiée sur des milieux supplémentés avec différents composés organiques (tributyryne, huile de colza, diesel et biodiesel). Les isolats ont poussé sur tous les milieux testés, avec une croissance plus importante sur les géloses supplémentées avec de l'huile de colza (Janda-Ulfig *et al.*, 2008).

**Tableau 4 :** Isolement des espèces du genre *Scedosporium* à partir de prélèvements environnementaux.

Pays	Référence	Espèce au sein du genre	Source des échantillons
USA	Ajello et Zeidberg, 1951	Non définie	Sol
USA	Ajello, 1952	Non définie	Sol
USA	Emmons, 1954	Non définie	NP
Canada	Cooke et Kabler, 1955	Non définie	Cours d'eau pollués, boues de stations d'épuration des eaux usées
USA	Ajello, 1956	Non définie	Sol
USA	Mcdonough <i>et al.</i> , 1961	Non définie	Sols riches en excréments, fumier sols des jardins, sol d'une grange
USA	Cazin <i>et al.</i> , 1962	Non définie	Sol
Inde	Pawar <i>et al.</i> , 1963	Non définie	Sable recouvert par la marée
Brésil	Rogers et Beneke, 1964	Non définie	Déjections d'oiseaux
Argentine	Varsavsky, 1964	Non définie	Terre du jardin d'une maison
USA	Dabrowa <i>et al.</i> , 1964	Non définie	Sable d'une plage, algues marines
Italie	Sotgiu <i>et al.</i> , 1966	Non définie	Sol
USA	Kirk, 1967	Non définie	Boues recouvertes d'eau de mer
USA	Brandsberg <i>et al.</i> , 1969	Non définie	Sol d'un perchoir de merl
Roumanie	Alteras and Evolceanu, 1969	Non définie	Sol riche en fumier, sol d'un jardin
USA	Kurup et Schmitt, 1970	Non définie	Sol d'un parc
Inde	Gugnani, 1972	Non définie	Poumons de la gerbille d'Inde ( <i>Tatera indica</i> )
Canada	Bell, 1976	Non définie	Fumier de bœuf
USA	Ramirez <i>et al.</i> , 1976	Non définie	Tractus gastro-intestinal de pigeons ( <i>Columba livia</i> )
Israël/Palestine	Ajello <i>et al.</i> , 1977	Non définie	Guano de chauves-souris, sol d'un pigeonier
Egypte	El Allawy <i>et al.</i> , 1977	Non définie	Pharynx d'ânes
Nigéria	Gugnani et Okafor, 1980	Non définie	Poumons de lézards ( <i>Agama agama</i> )
Italie	Polonelli <i>et al.</i> , 1981	Non définie	Sol fréquenté par des animaux domestiques
NP	Aho et Hirn, 1981	Non définie	Eau de piscines publiques couvertes
USA	Fisher JF <i>et al.</i> , 1982	Non définie	Eau de rivière
Canada	Bakerspigel et Schaus, 1984	Non définie	Sol d'un champ de tabac
Canada	Summerbell <i>et al.</i> , 1989	Non définie	Plantes en pots, canalisation de système de refroidissement



**Tableau 4 (suite) :** Isolement des espèces du genre *Scedosporium* à partir de prélèvements environnementaux.

Pays	Référence	Espèce	Source des échantillons
Canada	April <i>et al.</i> , 1998	Non définie	Sols imbibés d'huile, fumier de vache
Allemagne	Claußen et Schmidt, 1999	Non définie	Terrains agricoles
Allemagne	Vissiennon, 1999	Non définie	Sol de poulaillers
Canada	April <i>et al.</i> , 2000	Non définie	Sol de fosses à combustion de résidus pétroliers
Mexique	Auria <i>et al.</i> , 2000	Non définie	Tourbe d'un biofiltre de toluène
Turquie	Ceylan <i>et al.</i> , 2006	Non définie	Air au domicile de patients asthmatiques
Inde/Népal	Gugnani <i>et al.</i> , 2007	Non définie	Sol des terriers de rats de bambou ( <i>Cannomys badius</i> )
France	Sidot <i>et al.</i> , 2007	Non définie	Plantes en pot au domicile des patients, dessus d'un radiateur
Pologne	Janda-Ulfig <i>et al.</i> , 2008	Non définie	Boues de stations d'épuration des eaux usées
Portugal	Araujo <i>et al.</i> , 2008	Non définie	Air en milieu hospitalier
Canada	Saldanha <i>et al.</i> , 2008	Non définie	Air de locaux universitaires
Autriche	Kaltseis <i>et al.</i> , 2009	<i>S. apiospermum</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. dehoogii</i> , <i>S. aurantiacum</i> , <i>S. minutisporum</i>	Echantillons de sols
Royaume-Uni	Thornton, 2009	Non définie	Boues d'estuaire
Taiwan	Ko <i>et al.</i> , 2010	Non définie	Sols d'un champ agricole
Australie	Harun <i>et al.</i> , 2010	<i>S. aurantiacum</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. dehoogii</i>	Sols
Corée du Sud	Babu <i>et al.</i> , 2014	<i>S. boydii</i>	Sols d'un champ cultivé
France	Pham <i>et al.</i> , 2015	Non définie	Sols, eaux stagnantes
France	Rougeron <i>et al.</i> , 2015	<i>S. apiospermum</i> , <i>S. boydii</i> , <i>S. dehoogii</i> , <i>S. aurantiacum</i> , <i>S. minutisporum</i>	Sols, boues activées
Portugal	Ramos <i>et al.</i> , 2016	Non définie	Air en milieu urbain
Chine	Niu <i>et al.</i> , 2016	Non définie	Boues de stations d'épuration des eaux usées
Thaïlande	Luplertlop <i>et al.</i> , 2016	<i>S. apiospermum</i> , <i>S. dehoogii</i> , <i>S. aurantiacum</i> , <i>S. minutisporum</i>	Parcs et jardins publics de Bangkok

NP : non précisé.

Des travaux plus poussés ont démontré la capacité de *S. apiospermum* à dégrader différents composés aromatiques, à savoir le phénol, le p-crésol, le diaryl ester phénylbenzoate, le *p*-tolylbenzoate et le 4-chlorophénylbenzoate (Claußen et Schmidt, 1998; Claußen et Schmidt, 1999). *Scedosporium apiospermum* est d'ailleurs le champignon filamenteux prédominant des tourbes utilisées pour filtrer le toluène de l'air (Auria *et al.*, 2000) ; un des isolats de *S. apiospermum* de cette étude a même été utilisé dans un système de biofiltration du toluène présent dans l'air (García-Peña *et al.*, 2001).

A la suite des travaux du groupe de Josep Guarro, d'autres études environnementales ont été réalisées pour définir les caractéristiques écologiques des différentes espèces du complexe *S. apiospermum*. En effet les espèces du complexe se différencient par leur susceptibilité aux antifongiques, leur pathogénicité et leur prévalence dans les infections humaines. Ainsi, une meilleure connaissance sur les niches écologiques de ces espèces est nécessaire pour définir des mesures préventives visant à réduire l'exposition des patients à ces champignons. Dans cette perspective, les études écologiques ont montré des variations dans l'abondance des espèces du genre *Scedosporium* selon les pays et selon les environnements. En Autriche, *S. apiospermum* était l'espèce la plus fréquemment isolée suivie de *S. dehoogii* (Kaltseis *et al.*, 2009). En Australie, *S. aurantiacum* prédomine avec plus de 95% des isolats environnementaux du genre *Scedosporium*, *S. boydii* et *S. dehoogii* n'étant que rarement isolés (Harun *et al.*, 2010). En France, le schéma est différent, *S. dehoogii* est l'espèce la plus fréquente (39%) suivie de *S. aurantiacum* (22%), *S. apiospermum* (18%) et de *S. boydii* (18%) (Rougeron *et al.*, 2014).

De manière générale, la présence des *Scedosporium* est associée aux activités humaines. En France par exemple, 92% des échantillons collectés dans les zones agricoles ont révélé la présence de ces champignons, de même que 40% à 60% des prélèvements réalisés sur les berges de rivières, dans les parcs et aires de jeux en milieu urbain, les zones industrielles et les boues de stations d'épuration. A l'inverse, tous les échantillons prélevés en forêt étaient négatifs en culture pour le genre *Scedosporium* (Rougeron *et al.*, 2014). D'autre part, une corrélation positive a été établie entre la présence de ces champignons et la teneur en azote des échantillons de sols ainsi que des valeurs de pH entre 6,1 et 7,5 (Kaltseis *et al.*, 2009). De même, en France, la plupart des sols positifs en culture pour le genre *Scedosporium* avaient un pH compris entre 6,1 et 7,9.

### 3. Complexe d'espèces *Rasamsonia argillacea*

#### 3.1. Thermophilie et thermotolérance

Selon Cooney et Emerson (Cooney et Emerson, 1964), les champignons thermophiles présentent un optimum thermique supérieur ou égal à 37°C, et une capacité de croissance à des températures dépassant parfois 50°C. Quant aux champignons thermotolérants, leur optimum thermique est plus faible, 20-25°C, mais ils supportent des températures pouvant atteindre 45°C. Au cours des dernières décennies, une attention particulière a été portée aux champignons thermophiles comme source d'enzymes thermostables (Maheshwari *et al.*, 2000). Ces champignons thermophiles ne sont pas limités à un seul ordre taxonomique et on les retrouve distribués dans tout le règne des Fungi. A titre d'exemples, citons les *Rhizomucor* pour les Mucorales, *Myceliophthora* dans les Sordariales et *Talaromyces*, *Thermomyces*, *Thermoascus* ou *Rasamsonia* dans les Eurotiales (Mouchacca, 1997).

#### 3.2 Taxonomie

##### 3.2.2. Historique

Les espèces du genre *Rasamsonia* sont des champignons filamenteux thermophiles souvent isolés des environnements chauds (Yaguchi *et al.*, 2005; Houbraken *et al.*, 2012). Ces champignons ont été décrits pour la première fois en 1969 sous le nom de *Penicillium argillaceum* (Stolk *et al.*, 1969). Dix ans plus tard, Pitt (Pitt, 1979) propose le genre *Geosmithia* pour rassembler les isolats précédemment identifiés comme des *Penicillium*, mais dont les conidies n'étaient pas typiquement vertes et dont les phialides et les métules ont une paroi rugueuse. D'autre part, *Geosmithia argillacea* est l'anamorphe de *Talaromyces eburneus*, un champignon thermophile décrit pour la première fois en 1969 (Stolk *et al.*, 1969; Yaguchi *et al.*, 2005). En mycologie médicale et vétérinaire, le premier isolement de ces champignons chez l'homme date de 1999, avec une description sous le nom de *Penicillium emersonii* à partir d'un enfant français atteint de mucoviscidose (Cimon *et al.*, 1999), puis un autre isolement est rapporté en 2009 à partir d'un berger allemand présentant une infection disséminée (Grant *et al.*, 2009).

Récemment, Houbraken *et al.* (Houbraken *et al.*, 2012) ont montré que l'espèce *G. argillacea* et d'autres espèces du genre *Geosmithia* forment un clade distinct au sein des Trichocomaceae. Un nouveau genre, *Rasamsonia*, a été proposé en l'honneur de Robert A. Samson à l'occasion de son 65<sup>ème</sup> anniversaire et ses 40 ans d'activité au CBS (Centraal Bureau voor Schimmelcultures, Utrecht, Pays-Bas), ainsi que pour ses nombreuses contributions à la taxonomie des *Aspergillus* et *Penicillium*. Dans cette étude, la caractérisation moléculaire des membres thermotolérants ou thermophiles de la famille des Trichocomaceae y compris *G. argillacea*, *Talaromyces emersonii* et *Byssoschlamydoidea talaromyces* a été réalisée et les résultats ont été combinés avec les caractéristiques morphologiques et physiologiques. A l'issue de ces travaux, il a été établi que le genre

*Rasamsonia* comprend six espèces : *R. argillacea*, *R. brevistipitata*, *R. byssochlamydoides*, *R. cylindrospora*, *R. eburnea* et *R. emersonii*. Par la suite, deux espèces supplémentaires ont été caractérisées dans le genre *Rasamsonia* : il s'agit de *R. composticola*, isolée en Chine à partir de compost (Su et Cai, 2013) et *R. pulvericola* isolée cette fois à partir de la poussière prélevée d'une résidence à Songkhla, Thaïlande (Tanney et Seifert, 2013). Finalement, la diversité parmi plusieurs isolats de *R. argillacea* et de *R. eburnea* a été étudiée par séquençage partiel de plusieurs gènes (régions ITS, beta-tubuline et calmoduline) associé aux caractéristiques morphologiques. Les résultats ont révélé que *R. argillacea* constitue lui aussi un complexe d'espèces comprenant : *R. argillacea sensu stricto* et *Rasamsonia eburnea*, ainsi que deux nouvelles espèces, *Rasamsonia piperina* et *Rasamsonia aegroticola* (Houbraken *et al.*, 2013).

### 3.2.3. Taxonomie actuelle

Le genre *Rasamsonia* comporte donc dix espèces actuellement: *R. argillacea*, *R. aegroticola*, *R. brevistipitata*, *R. byssochlamydoides*, *R. composticola*, *R. cylindrospora*, *R. eburnea*, *R. emersonii*, *R. piperina* et *R. pulvericola*. Il s'agit de champignons présentant de grandes différences dans leur pathogénicité, de même que dans leur sensibilité aux antifongiques et dont l'identification morphologique reste difficile (Giraud *et al.*, 2013). Ils sont notamment facilement confondus avec des *Penicillium* ou des *Paecilomyces*.

## 3.3. Morphologie

### 3.3.1. Caractères cultureux

On peut distinguer les espèces du genre *Rasamsonia* par leurs caractéristiques phénotypiques, à savoir les températures optimales et maximales de croissance sur gélose au malt (malt extract agar), le taux de croissance sur gélose de Czapek (Czapek-yeast extract agar) et YES (yeast extract-sucrose-agar) et la couleur de la colonie au verso sur gélose au malt incubée à 37°C (Figure 11). *Rasamsonia emersonii*, *R. byssochlamydoides* et *R. composticola* sont thermophiles et ils ont une température optimale de croissance voisine de 45°C, alors que les autres espèces du genre *Rasamsonia* ont une température optimale de croissance un peu plus basse, 33°C pour *R. brevistipitata* et 36°C pour *R. cylindrospora* et les quatre espèces du complexe *R. argillacea*, *i.e.* *R. argillacea sensu stricto*, *R. eburnea*, *R. aegroticola* et *R. piperina* (Houbraken *et al.*, 2012, 2013; Su et Cai, 2013). La croissance est variable sur gélose de Czapek : elle est restreinte pour *R. piperina*, *R. brevistipitata*, *R. byssochlamydoides*, *R. cylindrospora* et *R. emersonii*, qui en outre sporulent peu sur ce milieu de culture, alors que *R. argillacea*, *R. aegroticola*, *R. eburnea* et *R. composticola* produisent des colonies assez étendues, de 25 à 40 mm de diamètre dans ces conditions de culture (Houbraken *et al.*, 2012).

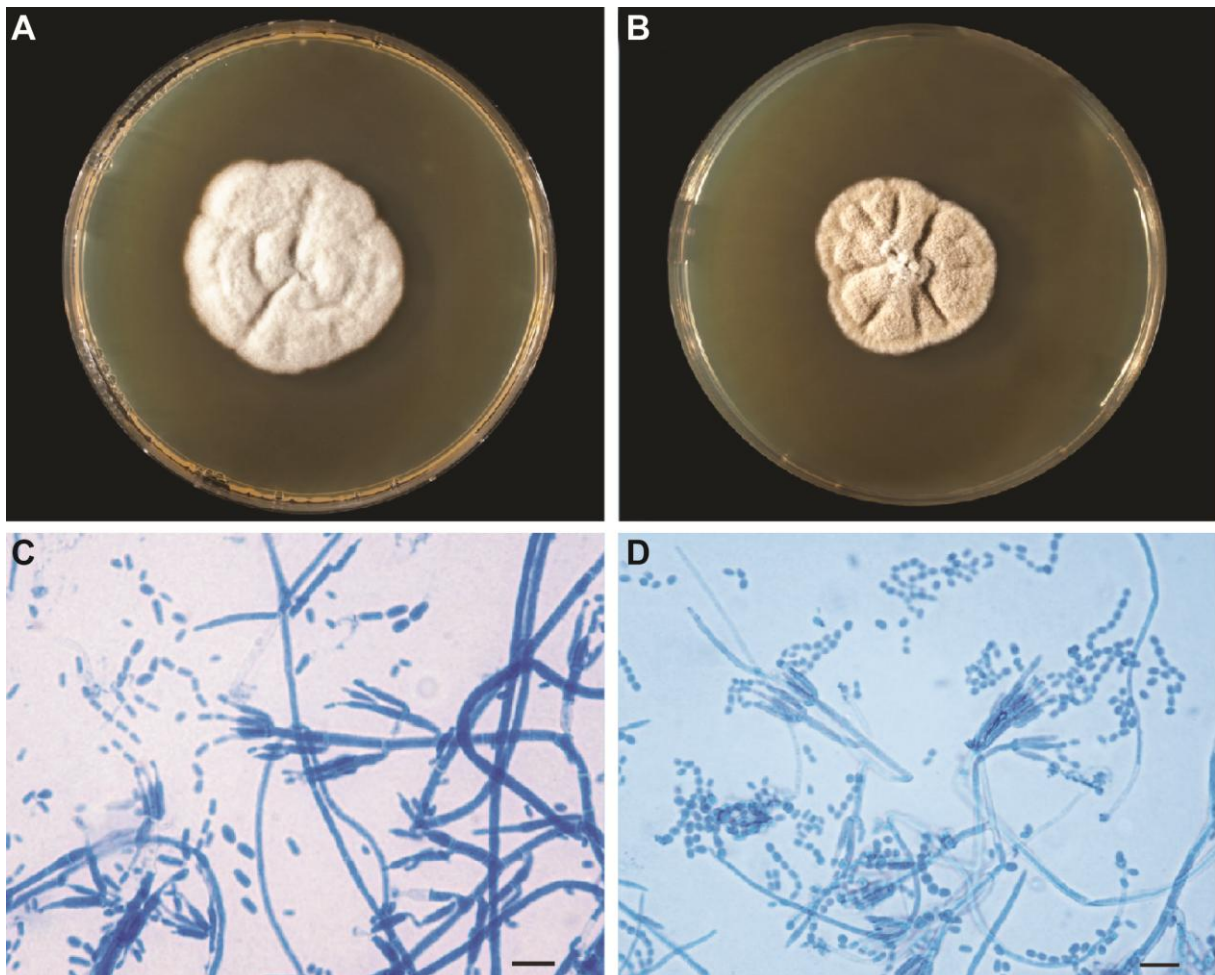
Les quatre espèces qui composent le complexe *R. argillacea*, sont phénotypiquement et génétiquement très proches, la principale différence étant que *R. eburnea* se caractérise par une couleur brun noirâtre des colonies au verso sur gélose au Malt à 36°C alors que le verso des colonies des trois autres espèces est brun grisâtre (Figure 11) (Houbraken *et al.*,

2013). Leur croissance est inhibée par le cycloheximide et le bénomyl et les milieux de culture semi-sélectifs développés pour la détection des champignons du genre *Scedosporium* ne sont donc pas utilisables pour les *Rasamsonia*.

Enfin, *R. pulvericola* est la seule espèce mésophile du genre avec une température optimale de croissance comprise entre 20°C et 35°C (Tanney et Seifert, 2013).

### 3.3.2. Aspect microscopique

Les espèces du complexe *R. argillacea* se différencient également par leurs aspects microscopiques. La taille et la forme des conidies, les caractéristiques des ascospores et les ramifications des conidiophores sont des caractères utiles pour la différenciation (Figure 11). *Rasamsonia cyclindrospora* se différencie des autres espèces du genre par des conidiophores irrégulièrement ramifiés et *R. eburnea* se caractérise par une rare formation des ascospores, qui ne sont détectées qu'après une incubation prolongée de 8 semaines sur milieu oatmeal agar (Houbraken *et al.*, 2012).



**Figure 11:** Morphologie macroscopique (A et B) et microscopique (C et D) de *R. aegroticola* (A et C) et *R. argillacea* (B et D) après 7 jours de culture à 37°C sur milieu YPDA. Noter l'aspect cylindrique des conidies et l'aspect effilé des phialides disposées en verticilles au sommet de conidiophores fins et cloisonnés (échelle = 10 µm).

### 3.4. Pathogénicité

Avant la fin des années 1990, le complexe d'espèces *R. argillacea*, précédemment connu sous le nom de *Geosmithia argillacea*, n'avait jamais été rapporté en situation pathogène, peut être en lien avec les difficultés d'identification de ces champignons, ces champignons étant fréquemment confondus avec des *Penicillium* ou des *Paecilomyces* comme indiqué ci-dessus (Giraud *et al.*, 2013). Le premier cas d'infection humaine a été signalé en 1999 (Cimon *et al.*, 1999). Chez l'animal, *R. argillacea* a été décrit pour la première fois en 2009, à l'origine d'une infection chez un berger allemand (Grant *et al.*, 2009). Depuis cette date, ces champignons ont été isolés régulièrement de l'animal (Salgüero *et al.*, 2013) ou de l'homme (Barker *et al.*, 2014; Del Chierico *et al.*, 2012; Houbraeken *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2012), principalement dans un contexte de mucoviscidose (Giraud *et al.*, 2010; Barton *et al.*, 2010; Manso *et al.*, 2011; Terpstra *et al.*, 2011; Marguet *et al.*, 2012; Labbé *et al.*, 2013; Masoud-Landgraf *et al.*, 2014; Matos *et al.*, 2015), mais aussi de granulomatose septique familiale (De Ravin *et al.*, 2011; Machouart *et al.*, 2011; Ishiwada *et al.*, 2015), de tuberculose (Sohn *et al.*, 2013), de greffe de moelle osseuse (Valentin *et al.*, 2012) ou après intervention chirurgicale avec pose d'une prothèse de l'aorte (Doyon *et al.*, 2013).

Face à cette augmentation de nombre des cas d'infection, Giraud *et al.* (Giraud *et al.*, 2013) ont suggéré que l'augmentation de la fréquence de ces champignons serait due à plusieurs facteurs, à savoir : une attention de plus en plus importante portée aux infections fongiques, l'amélioration des méthodes de détection des champignons, l'utilisation plus fréquente de techniques moléculaires (spécialement le séquençage d'ADN) et enfin, les changements dans les pratiques cliniques qui peuvent être à l'origine d'une pression de sélection plus importante.

La majorité des cas signalés d'infection par les espèces du complexe *R. argillacea* surviennent dans un contexte de mucoviscidose (70% des cas) ou de granulomatose septique familiale (11%) alors que seulement 10% des cas sont en relation avec une immunosuppression liée à la transplantation (Valentin *et al.*, 2012; Giraud *et al.*, 2013; Corzo-León *et al.*, 2015). Un cas d'infection invasive par *R. argillacea* a été rapporté dans le cadre d'un déficit congénital en facteur de transcription STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) (Duréault *et al.*, 2016). De plus, il a été rapporté récemment une infection disséminée fatale à *R. aegroticola* à la suite d'une transplantation pulmonaire chez une patiente atteinte de mucoviscidose et l'analyse rétrospective des isolats pré-greffe (initialement considérés comme des *Paecilomyces*) et post-greffe par séquençage des régions ITS (internal transcribed spacer) 1 et 2 des ADN ribosomiaux et par RAPD a montré qu'il s'agissait en fait de la même espèce et plus précisément du même génotype (Hong *et al.*, 2017). Enfin, trois cas d'infections animales ont été rapportés, tous chez des bergers allemands (Grant *et al.*, 2009; Salgüero *et al.*, 2013; Kawalilak *et al.*, 2015).

Les connaissances sur l'écologie de ces champignons et leurs réservoirs, et donc sur les modalités de contamination sont plus que limitées. Néanmoins, une contamination par inhalation de spores aéroportées est fortement suspectée. En effet bien qu'une infection cutanée puisse être suspectée dans un cas d'eczéma atopique, presque tous les isolats de

*R. argillacea sensu lato* rapportés dans la littérature ont été isolés à partir d'expectorations, d'aspirations bronchiques ou de biopsies pulmonaires. Des atteintes osseuses ou cérébrales peuvent survenir, secondaires à la colonisation des voies respiratoires (Giraud *et al.*, 2013).

### 3.5. Infections à *R. argillacea* dans la granulomatose septique familiale

L'incapacité des patients atteints de granulomatose septique familiale (CGD ou chronic granulomatose disease) à générer des radicaux libres oxygénés à effet microbicide, les prédispose aux infections dues à des champignons filamenteux, tels que les *Aspergillus*, qui sont les principales causes de morbidité et de mortalité (Gallin et Zarembler, 2007; Segal *et al.*, 2000).

De Ravin *et al.* (De Ravin *et al.*, 2011) ont décrit les premiers cas d'infection par le complexe *R. argillacea* dans ce contexte clinique. Il s'agissait de mycoses invasives survenues aux USA chez sept patients atteints de CGD, avec dans 5 cas une erreur d'identification préalable de l'agent causal comme *Paecilomyces variotii*. Par la suite, deux autres cas ont été rapportés dans ce contexte (Machouart *et al.*, 2011).

Huit de ces neuf patients ont souffert d'infections graves et durables, et la pneumonie était la traduction clinique la plus fréquente. Le dernier cas correspondait à une infection invasive lors d'une greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques provenant d'un donneur non apparenté.

Pour quatre de ces patients, ces infections se sont produites alors qu'ils recevaient un traitement antifongique à long terme (basé principalement sur les antifongiques azolés). Malgré un traitement antifongique, ces infections se sont rapidement propagées depuis les poumons jusqu'au cerveau. Une manifestation clinique avec une telle agressivité et qui était réfractaire à la thérapie antifongique ressemble à celle due à d'autres champignons filamenteux dans le cadre de la CGD. En effet, *Aspergillus nidulans* ou *Neosartorya udagawae* ont déjà été décrits comme étant responsables d'aspergillose invasive chez les patients atteints de CGD, avec dissémination hématogène et invasion du tissu osseux (Dotis et Roilides, 2004; Vinh *et al.*, 2009).

Les séquences ITS de huit des neuf souches du complexe *R. argillacea* collectées à partir de ces patients sont disponibles sur GenBank. Leur analyse montre que cinq de ces souches sont des *R. aegroticola*, deux correspondent à *R. argillacea sensu stricto* alors que la dernière est de position taxonomique incertaine et pourrait correspondre à une nouvelle espèce (Houbraken *et al.*, 2013).

### 3.6. Diagnostic et identification

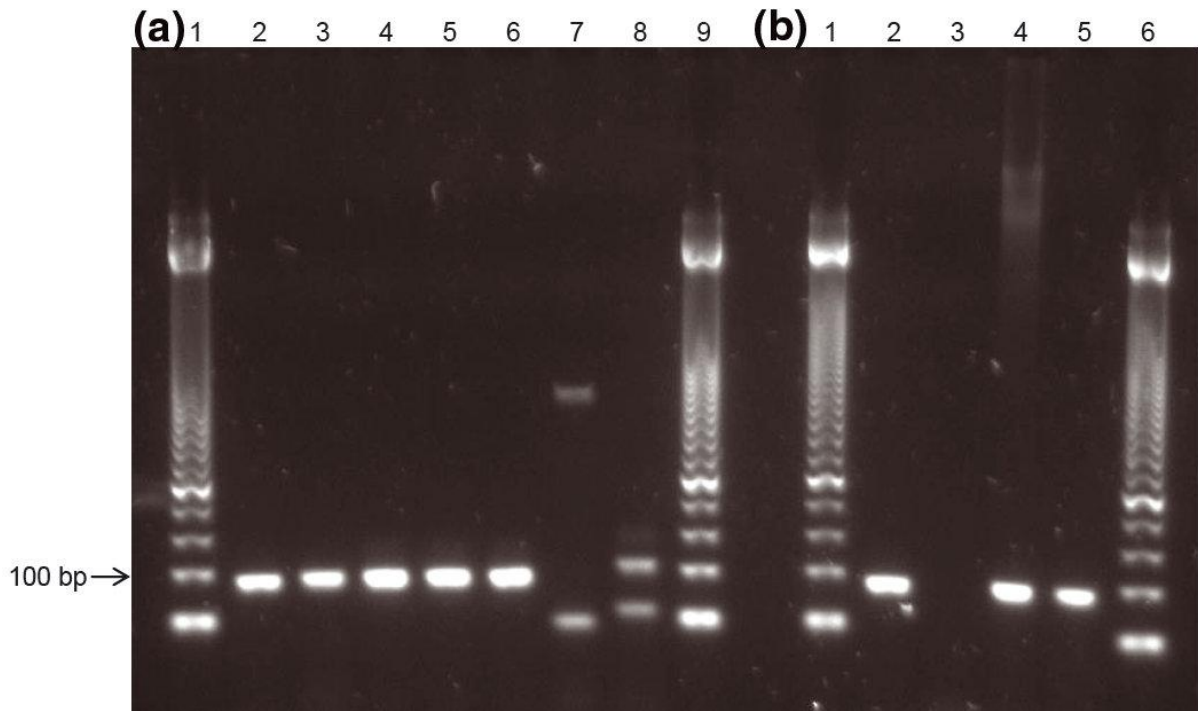
A ce jour, le diagnostic des espèces du complexe *R. argillacea* repose sur l'isolement des ces champignons dans un contexte infectieux. L'identification correcte de ces pathogènes sur la base de leurs morphologies macroscopiques et microscopiques est difficile, la morphologie microscopique étant très proche de celle des *Penicillium* et *Paecilomyces* notamment. Dans ce contexte, Del Chierico *et al.* (Del Chierico *et al.*, 2012) ont les premiers proposé d'appliquer la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF à l'identification de ces champignons. Des spectres de référence ont été établis pour le complexe *R. argillacea*, puis appliqués à l'identification d'isolats cliniques ; les résultats obtenus ont montré une très bonne concordance avec ceux résultant de l'examen morphologique et de l'identification moléculaire. Cependant, cette étude a été réalisée sur la base de l'ancienne nomenclature, et une mise à jour de la base des données avec la nouvelle taxonomie est nécessaire. Récemment Steinmann *et al.* (Steinmann *et al.*, 2014) ont développé une technique de PCR en temps réel (PrimerDesign™, Southampton, UK) pour la détection et l'identification directe des espèces du complexe *R. argillacea*. Ce kit d'identification a été validé d'abord sur une collection de souches de référence et des isolats cliniques du genre *Rasamsonia*, puis sur des expectorations de patients atteints de mucoviscidose : les trois espèces rencontrées dans la mucoviscidose (*R. argillacea*, *R. piperina* et *R. aegroticola*) ont été détectées, alors qu'aucune amplification n'était observée pour les autres espèces fongiques ou bactériennes testées (Figure 12).

### 3.7. Sensibilité aux antifongiques

L'identification précise des espèces du complexe *R. argillacea* est non seulement importante pour les différencier de champignons non pathogènes, mais elle est également cruciale d'un point de vue thérapeutique. En effet, les profils de sensibilité des espèces du complexe *R. argillacea* sont différents de ceux de beaucoup d'autres moisissures (Steinmann *et al.*, 2014).

Les tests de sensibilité *in vitro* aux antifongiques ont montré que les antifongiques de la classe des échinocandines sont les plus actifs contre les espèces du complexe *R. argillacea*. Toutes les souches qui ont été testées étaient naturellement résistantes au voriconazole, et la plupart étaient résistantes aux autres triazolés ainsi qu'à l'amphotéricine B. A l'inverse, la caspofungine qui est l'échinocandine la plus souvent utilisée, s'est révélée active sur toutes les souches testées. Cependant, lorsque la micafungine et l'anidulafungine ont été testées, les valeurs de leurs concentrations minimales inhibitrices étaient toujours inférieures à celles obtenues pour la caspofungine. La terbinafine a montré également une haute efficacité, mais elle n'a été évaluée que sur un nombre réduit d'isolats (Giraud *et al.*, 2010; Houbraken *et al.*, 2013).





**Figure 12 :** Détection des espèces du complexe *R. argillacea* par PCR en temps réel (Steinmann *et al.*, 2014).

- (a)** Résultats obtenus avec des extraits d'ADN provenant de cultures pures de souches de référence. 1 et 9 : marqueur de taille (50 pb); 2 : *R. argillacea*; 3 : *R. eburnea*; 4 : *R. aegroticola*; 5 : *R. piperina*; 6 : *R. argillacea*; 7 : *R. cylindrospora*; 8 : *R. brevistipitata*.
- (b)** Résultats obtenus avec des extraits d'ADN provenant d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose. 1 et 6 : marqueur de taille (50 pb); 2 : souche de référence *R. argillacea*; 3 : expectoration négative pour le complexe *R. argillacea*; 4 : expectoration positive à *R. argillacea*; 5 : expectoration positive à *R. aegroticola*.

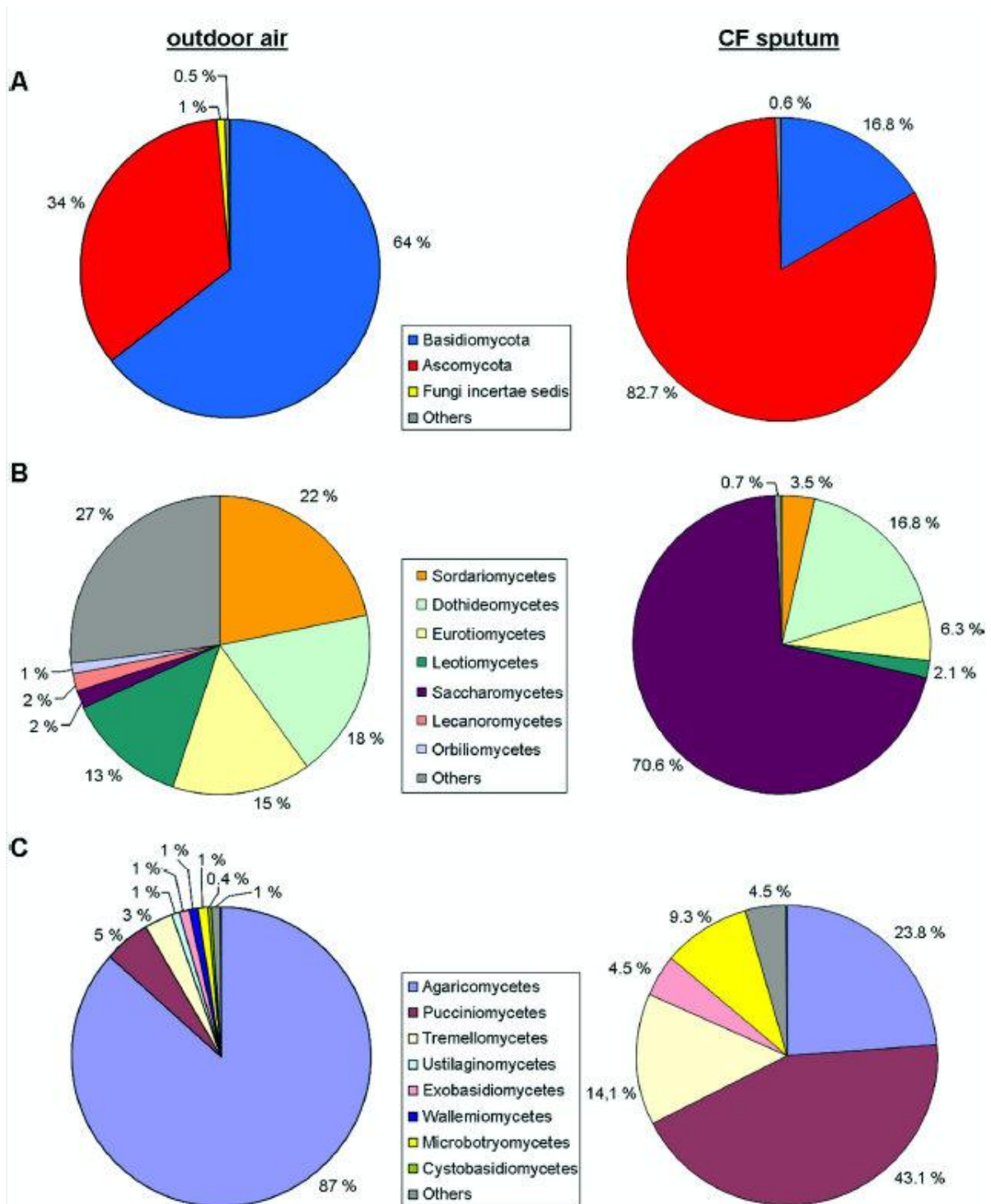
### 4. Epidémiologie des infections fongiques au cours de la mucoviscidose

Le règne des champignons comprend plus d'un million d'espèces, mais seules un petit nombre d'entre elles sont thermophiles ou thermotolérantes, en particulier certains *Aspergillus* et certaines levures qui sont capables de croître à 37°C et ainsi de s'installer dans les voies respiratoires. Ces champignons sont pour la plupart des espèces ubiquitaires et saprophytes dans l'environnement : sol, eau et matières organiques en décomposition. Les champignons dispersent leurs spores dans l'environnement. Ces spores sont hydrophobes, et donc maintenues en suspension dans l'air. Par ailleurs, leur petite taille leur permet de pénétrer profondément dans les voies respiratoires, et d'atteindre les alvéoles pulmonaires. Chez les individus sains, ces spores sont éliminées par la clairance mucociliaire et la phagocytose par les cellules du système immunitaire inné, telles que les macrophages et les neutrophiles. Cependant chez les patients atteints de mucoviscidose, l'altération de la clairance mucociliaire et la capacité de certains champignons à échapper aux défenses immunitaires de l'hôte peut conduire à une colonisation des voies respiratoires, voire une infection locale à type de broncho-pneumopathie ou de manifestations allergiques comme les mycoses broncho-pulmonaires allergiques.

Face à la complexité de la flore fongique chez les patients atteints de mucoviscidose, plusieurs études ont été réalisées avec pour objectif de déterminer la place et la contribution de ces infections/colonisations dans les manifestations respiratoires chez les patients CF, ainsi que les profils de colonisation (chronique ou transitoire) engendrés par les différentes espèces fongiques en cause. De plus, la virulence ainsi que le profil de sensibilité aux antifongiques est très variable d'une espèce à l'autre, voire même entre souches d'une même espèce (avec l'émergence de la résistance acquise aux antifongiques azolés). Par conséquent, la prévention est d'une grande importance, et le typage moléculaire d'un grand ensemble d'isolats environnementaux et cliniques est nécessaire pour mieux connaître l'épidémiologie des infections fongiques dans la mucoviscidose, et notamment pour identifier les sources de contamination.

#### 4.1. Exposition aux champignons filamenteux au cours de la mucoviscidose

Le tractus respiratoire supérieur représente la principale porte d'entrée des micro-organismes aéroportés comme les bactéries, les virus et les spores fongiques. Il a été montré qu'il peut y avoir plus de 50000 spores de champignons par m<sup>3</sup> d'air (Pashley *et al.*, 2012a). Une grande diversité d'espèces fongiques est ainsi inhalée régulièrement. Les caractéristiques des micro-organismes (degré de pathogénicité et virulence) et la réponse immunitaire de l'hôte vont déterminer l'issue de cette contamination : élimination des spores inhalées, ou à l'inverse adhésion et colonisation des voies respiratoires, avec parfois pour conséquence une complication pulmonaire (Nguyen *et al.*, 2015). Dans la mucoviscidose, les espèces fongiques aéroportées capables de coloniser les voies respiratoires sont en nombre limité et, hormis *A. fumigatus*, ces espèces sont particulièrement rares dans l'air (Figure 14).



**Figure 13:** Proportions relatives des champignons dans l'air et dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose (Kramer *et al.*, 2015).

### 4.2. Examen mycologique des expectorations

Un des problèmes majeurs de l'étude de l'épidémiologie des infections fongiques dans la mucoviscidose est le manque de standardisation de l'examen mycologique des expectorations. De plus, il est difficile d'interpréter la présence de champignons dans les sécrétions respiratoires des patients atteints de mucoviscidose car elle peut aussi bien traduire : (1) une présence transitoire suite à l'inhalation de spores fongiques présentes dans l'air ; (2) une colonisation des voies respiratoires sans aucun signe clinique, semblable à la présence d'une flore commensale ; ou encore (3) une infection morbide des voies respiratoires (Nagano *et al.*, 2010).

Les différentes méthodes de traitement et de culture des expectorations ainsi que l'utilisation de différents milieux de culture sont probablement à la base des variations dans la fréquence des espèces fongiques isolées dans le contexte de la mucoviscidose (Borman *et al.*, 2010). Pashley *et al.* (Pashley *et al.*, 2012b) ont comparé différentes méthodes de traitement des expectorations (homogénéisation et dilution) : ces auteurs ont constaté que la fréquence de détection des espèces du genre *Aspergillus* dépend du volume et de la dilution des expectorations utilisées. En outre, les milieux de culture additionnés d'antibiotiques sont plus efficaces comparés aux milieux bactériologiques. A titre d'exemple, dans une étude portant sur 77 patients atteints de mucoviscidose, la fréquence de détection des espèces fongiques dans les expectorations était de 18% (14/77) avec l'utilisation des milieux de culture conventionnels contre 78% (60/77) avec l'utilisation de milieux de culture additionnés d'antibiotiques (Nagano *et al.*, 2010).

De même, Borman *et al.* (Borman *et al.*, 2010) ont comparé les protocoles utilisés dans différents laboratoires européens (6 en France et 2 en Angleterre) et leurs performances en terme de diversité et de prévalence de la flore fongique dans les sécrétions respiratoires. De profondes différences ont été constatées dans les protocoles utilisés pour l'examen mycologique des expectorations des patients atteints de mucoviscidose, portant aussi bien sur le volume d'expectoration analysé, les milieux de culture utilisés ou encore la température et la durée d'incubation. Ces différences pourraient expliquer les larges variations observées d'un centre à l'autre dans la fréquence des différentes espèces fongiques détectées, même dans des centres d'une même zone géographique ou sur la même population de patients. Par exemple, sur la même cohorte, la même période et le même laboratoire, le nombre d'échantillons positifs pour les espèces du genre *Scedosporium* était de 15 (6%) sur gélose YPDA additionnée de cycloheximide contre 35 (14%) sur gélose DRBC-bénomyl. L'utilisation de milieux de culture semi-sélectifs facilite considérablement la détection de *S. apiospermum*, vraisemblablement en inhibant la croissance plus rapide et extensive d'*A. fumigatus*, qui est régulièrement associé à *S. apiospermum* dans les voies respiratoires des patients.

Des techniques moléculaires ont par ailleurs prouvé leur efficacité comme alternatives aux méthodes classiques pour l'analyse de la flore fongique dans les expectorations (Bouchara *et al.*, 2009; Delhaes *et al.*, 2012; Willger *et al.*, 2014; Kramer *et al.*, 2015). Ces techniques basées sur la détection directe de l'ADN fongique dans les sécrétions pulmonaires permettent à la fois la détection et l'identification des champignons.

En outre, les techniques moléculaires permettent également la détection d'espèces non cultivables comme celle des espèces à croissance lente. Ainsi Delhaes *et al.* (Delhaes *et al.*, 2012) ont analysé la flore fongique de 8 expectorations par méthode classique de culture et parallèlement par une approche moléculaire basée sur l'amplification de la région ITS2 et le pyroséquençage. Seulement 60% des champignons identifiés par cette technique moléculaire sont détectés par culture. Des résultats similaires ont été publiés dans d'autres contextes, notamment par Ghannoum *et al.* (Ghannoum *et al.*, 2010) pour qui les champignons non cultivables représentent 36,1% de la flore fongique buccale chez des personnes en bonne santé.

### 4.3. Génotypage des champignons filamenteux dans la mucoviscidose

Si l'isolement d'un champignon par mise en culture d'un prélèvement respiratoire signe la présence du microorganisme dans les voies respiratoires du patient, une question persiste sur la signification clinique de cette colonisation fongique. Dans ce contexte, seul l'isolement répété du microorganisme et la caractérisation génotypique des isolats successifs permet de différencier un portage transitoire de génotypes toujours différents et donc sans conséquence clinique d'une véritable colonisation chronique des voies respiratoires qui immanquablement participe à la réaction inflammatoire et à la dégradation progressive de la fonction pulmonaire. Le typage est donc nécessaire pour guider la décision thérapeutique.

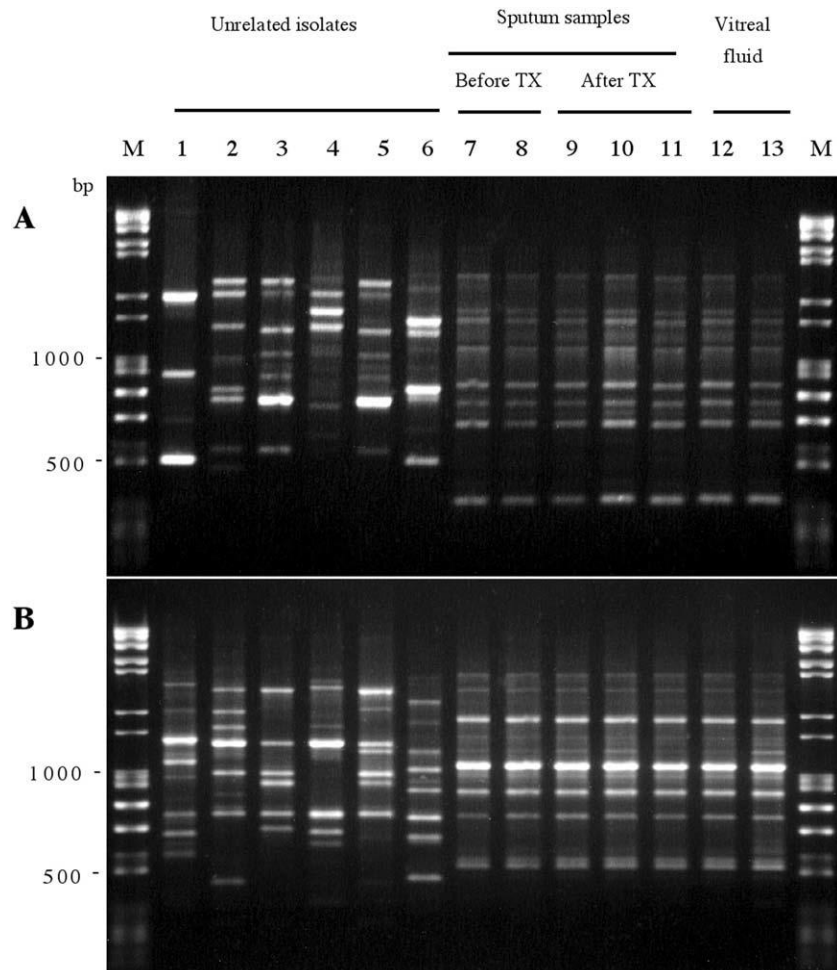
Pour longtemps, le typage a consisté dans l'étude de caractères phénotypiques comme la morphologie des colonies associée à des tests biochimiques ou sérologiques ou encore à l'étude du profil de sensibilité aux antifongiques. Cependant, ces méthodes étaient peu reproductibles, et surtout d'un pouvoir discriminant limité (Gil-Lamaignere *et al.*, 2003). Avec le développement des méthodes d'étude de l'ADN, de nouvelles techniques beaucoup plus reproductibles ont été proposées permettant l'étude de la variabilité infraspécifique.

#### 4.3.1. Amplification aléatoire d'ADN polymorphique (RAPD)

La RAPD (pour *random amplification of polymorphic DNA*) est une technique d'empreinte génétique basée sur l'amplification aléatoire par PCR de fragments d'ADN en utilisant une amorce de séquence courte, d'une dizaine de paires de bases. La séquence des amorces utilisées en RAPD est établie de manière aléatoire et ces amorces ont des températures d'hybridation relativement faibles (entre 20 et 30°C). Ces caractéristiques permettent à l'amorce de s'hybrider en différentes positions dans le génome, permettant ainsi d'amplifier un nombre variable de fragments (Williams *et al.*, 1990). Cependant, pour chaque espèce, il faut utiliser en parallèle plusieurs amorces séparément et les amplicons obtenus pour chaque amorce sont par la suite séparés par électrophorèse sur gel d'agarose. Enfin, le génotype RAPD d'un isolat est obtenu en combinant les profils électrophorétiques obtenus avec chacune des amorces. Ainsi, dans le contexte d'une infection disséminée par *S. apiospermum* suite à une double transplantation pulmonaire chez un patient atteint de mucoviscidose, la RAPD a permis de démontrer que cette infection était la conséquence de la colonisation des voies respiratoires du patient avant l'intervention chirurgicale devant la

mise en évidence d'un génotype commun entre des isolats cliniques provenant des expectorations du patient collectées dans les mois précédant la transplantation et ceux obtenus durant l'infection disséminée post-transplantation (Figure 14) (Symoens *et al.*, 2006).

La RAPD est facile à réaliser, rapide et ne demande qu'une faible quantité d'ADN. De plus, cette technique ne nécessite pas de connaissance préalable sur le génome de l'espèce étudiée. Bien qu'elle ait une reproductibilité inter-laboratoire limitée, cette méthode a été largement utilisée pour le typage de champignons d'intérêt médical (Harun *et al.*, 2009).



**Figure 14** : Profils RAPD des souches de *S. apiospermum* analysées par Symoens *et al.* (Symoens *et al.*, 2006) avec les amorces UBC 701 (A) et UBC 703 (B).

Pistes 1-6 : isolats épidémiologiquement indépendants.

Pistes 7- 8 : isolats obtenus à partir des expectorations avant la transplantation.

Pistes 9-11 : isolats obtenus à partir des expectorations après la transplantation.

Pistes 12-13 : isolats obtenus à partir l'humeur vitrée après la transplantation.

M : marqueur de taille 100 pb.

### 4.3.2. Amplification de séquences répétitives palindromiques (rep-PCR)

La rep-PCR est une technique de typage semblable à la RAPD qui consiste en l'amplification des séquences répétitives non codantes dispersés dans le génome. Les produits d'amplification sont en suite séparés par électrophorèse et les profils électrophorétiques obtenus sont comparés pour étudier le polymorphisme entre les isolats.

Le système DiversiLab<sup>®</sup> (bioMérieux) est un système commercial conçu pour standardiser et simplifier l'usage de la rep-PCR par une automatisation. Il permet à la fois : (i) la réalisation des PCR avec des amorces permettant d'amplifier les séquences comprises entre ces séquences répétitives ; (ii) le marquage des produits d'amplification par fluorescence ; (iii) la séparation des amplicons par électrophorèse capillaire et ; (iv) la comparaison des profils électrophorétiques et l'élaboration des dendrogrammes pour les isolats étudiés (Figure 15) (Healy *et al.*, 2004).

La rep-PCR a été appliquée avec succès pour l'identification des espèces dans divers groupes de champignons, y compris les espèces des genres *Aspergillus* (Healy *et al.*, 2004) et *Fusarium* (Healy *et al.*, 2005), comme pour la différenciation infraspécifique dans le genre *Aspergillus* (Healy *et al.*, 2004).

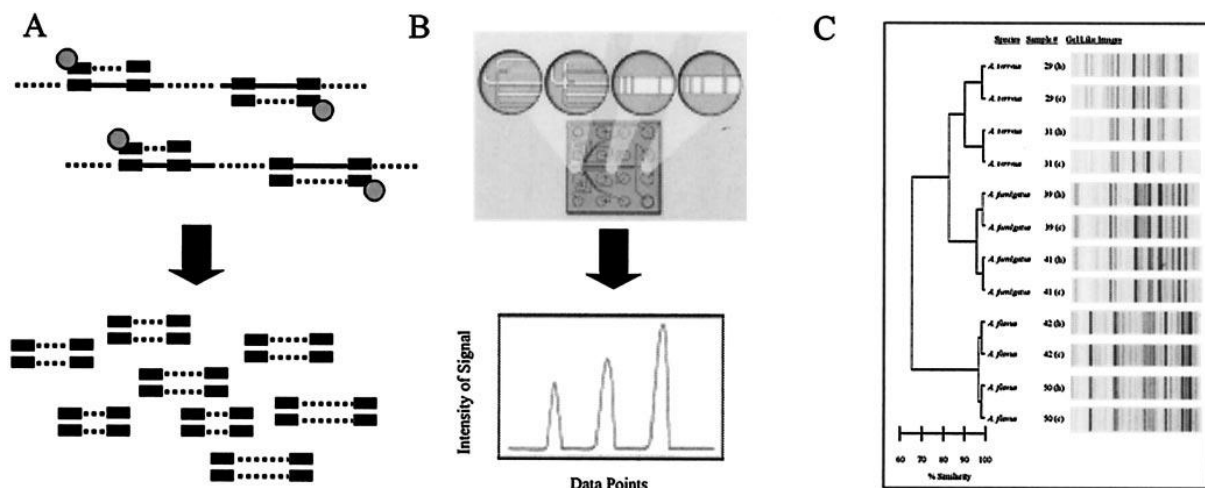


Figure 15 : Schéma de la rep-PCR automatisée et du système DiversiLab<sup>®</sup> (Healy *et al.*, 2004).

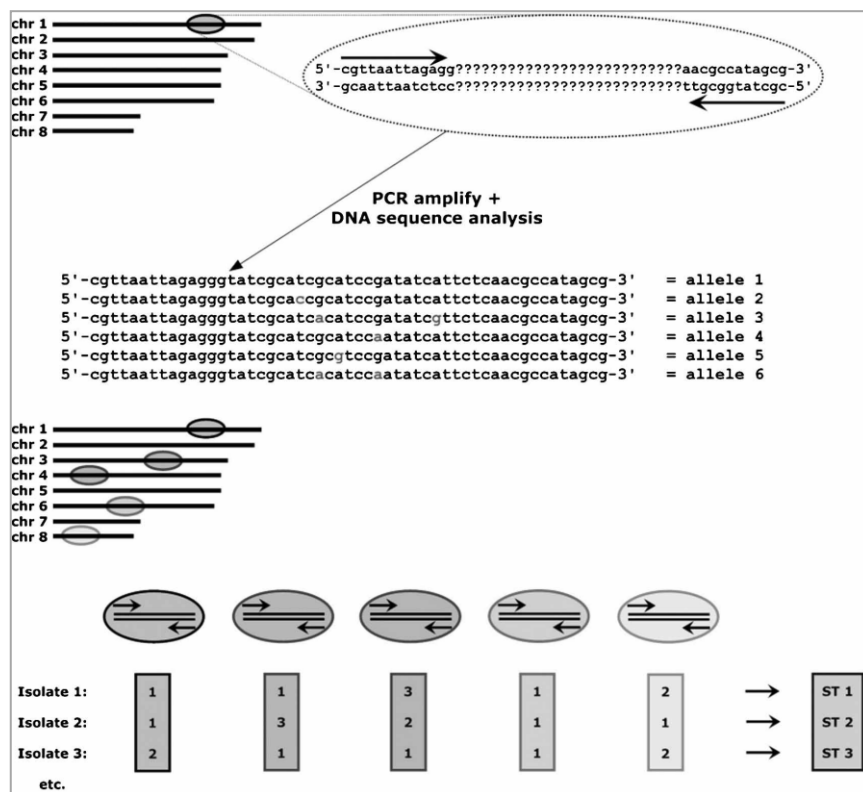
A : Hybridation des amorces spécifiques et amplification ; B : Electrophorèse capillaire et obtention des profils électrophorétiques ; C : un rapport DiversiLab<sup>®</sup> représenté sous forme d'un dendrogramme.

### 4.3.3. Typage par séquençage multi-loci (MLST)

La MLST (pour *multilocus sequence typing*) est une technique de typage des microorganismes basée sur l'analyse des variations nucléotidiques des séquences partielles de cinq à dix gènes constitutifs. Pour chaque locus étudié, les différentes séquences obtenues représentent des allèles distincts. La combinaison des allèles identifiés pour les différents loci définit le profil allélique ou la séquence type (ST) de l'isolat étudié. La MLST présente donc une excellente reproductibilité inter-laboratoires si les mêmes amorces et les

mêmes conditions d'amplification sont utilisées. D'autre part, les données obtenues par MLST sont habituellement analysées à l'aide d'applications Web permettant une standardisation dans l'attribution des numéros des allèles et des ST. Néanmoins, bien que le principe de la MLST soit très simple, il est indispensable d'avoir des séquences de haute qualité pour une identification correcte des allèles (Figure 16) (Klaassen, 2009).

Cette technique, initialement développée pour la caractérisation de bactéries (Maiden *et al.*, 1998), a ensuite été appliquée au typage de champignons filamenteux, tels qu'*A. fumigatus* (Bain *et al.*, 2007), *Fusarium oxysporum* (O'Donnell *et al.*, 2004) et les *Scedosporium* (Harun *et al.*, 2009 ; Bernhardt *et al.*, 2013).



**Figure 16:** Principe du typage par séquençage multi-loci (MLST) (Klaassen, 2009).

### 4.3.4. Analyse de marqueurs microsatellites

Les microsatellites sont des fragments d'ADN courts (jusqu'à 10 pb), répétés en tandem, abondamment rencontrés dans le génome de la plupart des champignons. Les microsatellites sont amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques de la région flanquante de la répétition. Les amorces utilisées peuvent être marquées par un fluorophore, ce qui permet par la suite de déterminer la taille relative du fragment par électrophorèse capillaire (Klaassen, 2009).

Chez les champignons, le génome peut contenir des centaines à des milliers de microsatellites qui diffèrent par le nombre d'unités de répétition ainsi que par la taille et la séquence de l'unité de répétition. Ceci explique le pouvoir discriminant très important de cette méthode (Klaassen, 2009).



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

Décrite pour la première fois en 1995, l'AFLP (pour *amplified fragment length polymorphism*) comprend trois étapes : (i) la digestion de l'ADN par des enzymes de restriction et la ligation d'adaptateurs spécifiques aux extrémités des fragments de restriction obtenus ; (ii) l'amplification par PCR à l'aide d'amorces spécifiques des adaptateurs ; et (iii) l'analyse de l'ensemble des fragments amplifiés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide (Vos *et al.*, 1995). Cette technique de génotypage est facile à réaliser et présente un pouvoir discriminant élevé, mais l'interprétation des résultats est délicate et la technique est relativement coûteuse (Harun *et al.*, 2009).

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

La RFLP (pour *restriction fragment length polymorphism*) consiste en une digestion de l'ADN génomique par des endonucléases (enzymes de restriction), suivie de la séparation des fragments obtenus par électrophorèse sur gel d'agarose. Cette digestion génère des profils électrophorétiques basés sur le nombre et la longueur des fragments de restriction obtenus. Le polymorphisme des souches peut se produire à la suite de mutations ponctuelles dans la séquence du site de restriction, l'acquisition ou la perte de sites de restriction, ou encore une insertion et/ou une délétion dans la séquence entre des sites de restriction. Ces mutations génèrent des variations dans le nombre et/ou la taille des fragments et donc une variation dans les profils électrophorétiques (Gil-Lamaignere *et al.*, 2003).

Les fragments de restriction générés par la RFLP peuvent également être transférés sur une membrane de nylon ce qui va permettre par la suite l'hybridation de ces fragments avec des sondes marquées spécifiques d'espèce. De cette manière, seul un nombre restreint des fragments de restriction sont sélectionnés pour la comparaison des profils (Gil-Lamaignere *et al.*, 2003).

## 4.4. Les principaux champignons filamenteux colonisant les voies respiratoires des patients

### 4.4.1. Espèces du genre *Aspergillus*

Parmi les *Aspergillus*, *A. fumigatus* et *A. terreus* sont les espèces les plus souvent rencontrées dans le contexte de la mucoviscidose, avec une prévalence variant de 6 à 58% pour *A. fumigatus* et de 1,9 à 6.2% pour *A. terreus* (Pihet *et al.*, 2009; LiPuma, 2010). Comme précédemment indiqué, ces variations de fréquence peuvent s'expliquer par l'absence de standardisation des protocoles utilisés pour l'examen mycologique des expectorations (Liu *et al.*, 2013). Néanmoins, d'autres facteurs doivent être pris en considération, liés aux patients eux-mêmes, comme la nature des mutations sur le gène *CFTR* ou l'âge des patients. En effet, la colonisation des voies respiratoires par *A. fumigatus* est rare chez les jeunes enfants et survient habituellement après les infections bactériennes. Récemment, Coburn *et al.* (Coburn *et al.*, 2015) ont caractérisé le microbiote pulmonaire

dans une cohorte de 269 patients CF (âgés de 4-60 ans) dont 76 avaient moins de 18 ans. Les *Aspergillus* étaient beaucoup plus fréquents chez les adultes (33,5% contre 17,1% chez les enfants avec  $p = 0,011$ ). Dans une autre étude, l'âge moyen au moment du premier isolement d'*A. fumigatus* était de 12,3 ans (Pihet *et al.*, 2009). Cependant des réponses immunitaires contre *A. fumigatus* ont été détectées (IgG et IgE) beaucoup plus tôt chez les enfants atteints de mucoviscidose (4-10 ans) (el-Dahr *et al.*, 1994; Fillaux *et al.*, 2014).

La colonisation des voies respiratoires par *A. fumigatus* peut se manifester de plusieurs manières, par une bronchite aspergillaire, une aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA), un aspergillome ou encore une aspergillose invasive en cas de déficit immunitaire. La manifestation clinique la plus importante en relation avec *A. fumigatus* reste l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (Pihet *et al.*, 2009). Néanmoins, certains patients ne présente aucune manifestation clinique et la prédisposition des patients atteints de mucoviscidose pour les maladies fongiques pulmonaires n'est pas claire (Bush *et al.*, 2015). Il a cependant été démontré que la présence d'*A. fumigatus* dans les voies respiratoires est associée à une dégradation significative de la fonction respiratoire et à l'apparition d'anomalies radiographiques pulmonaires (Amin *et al.*, 2010; de Vrankrijker *et al.*, 2011; McMahon *et al.*, 2012).

La colonisation fongique des voies respiratoires peut être transitoire (portage transitoire sans réelle conséquence clinique) ou bien chronique avec une réaction inflammatoire à l'origine de la détérioration progressive de la fonction respiratoire. Ceci montre l'importance de l'étude génotypique pour déterminer les profils de colonisation des souches fongiques isolées des voies respiratoires. Pour *A. fumigatus*, plusieurs génotypes peuvent être détectés dans les expectorations des patients CF (Verweij *et al.*, 1996; Neuvéglise *et al.*, 1997; Cimon *et al.*, 2001; Vanhee *et al.*, 2008; de Valk *et al.*, 2009) et deux profils peuvent être observés : (1) une colonisation par des génotypes identiques ou très proches isolés tout au long du suivi du patient témoignant d'une incapacité à éradiquer ces souches ; ou (2) une succession de génotypes toujours différents suggérant une clairance efficace et l'incapacité de ces isolats à s'installer de manière durable dans les voies respiratoires (Liu *et al.*, 2013).

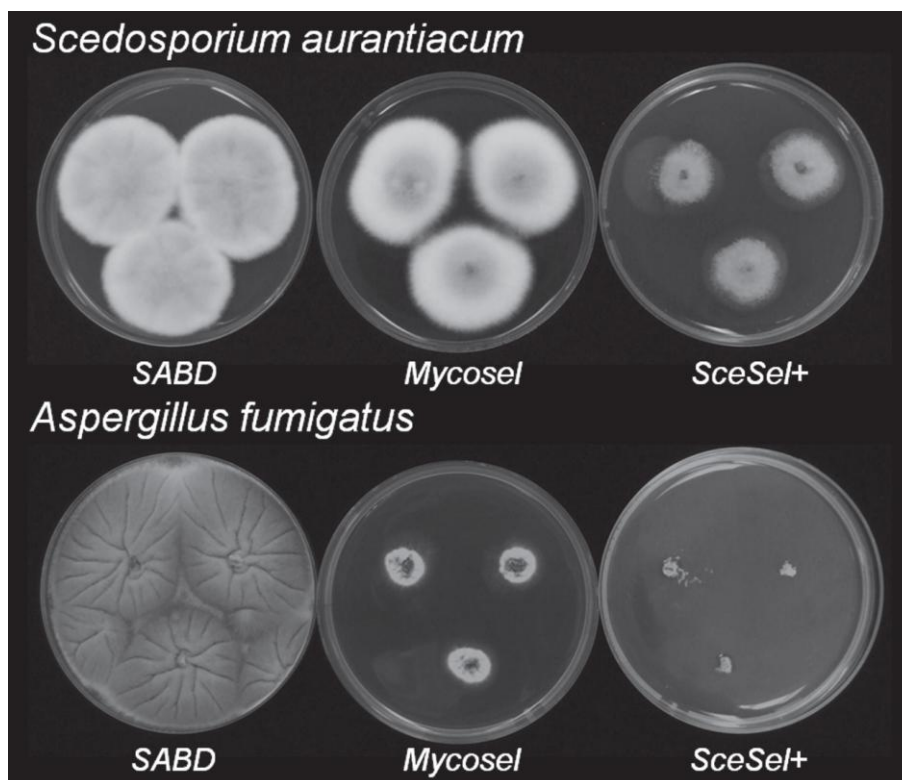
D'autres espèces peuvent être rencontrées dans le cadre de la mucoviscidose. Ainsi, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* et *Aspergillus nidulans* ont été détectés respectivement parmi 3,4%, 2,9% et 1,9% des 210 patients suivis par Paugam *et al.* (Paugam *et al.*, 2010). Cependant, la détection de ces espèces dans les voies respiratoires est souvent transitoire (Pihet *et al.*, 2009) contrairement à *Aspergillus terreus* qui s'est montré souvent capable de coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. L'étude génotypique d'isolats séquentiels d'*A. terreus* montre d'ailleurs des profils de colonisation des voies respiratoires par ce pathogène comparables à ceux décrits pour *A. fumigatus* (Rougeron *et al.*, 2014).

#### 4.4.2. Espèces du genre *Scedosporium*

En 1991, *S. apiospermum* a été rapporté pour la première fois dans le cadre de la mucoviscidose après l'isolement de ce pathogène à partir des expectorations de trois

patients atteints de mucoviscidose (Chabasse *et al.*, 1991). Depuis cette date, les espèces du genre *Scedosporium* sont devenues des pathogènes émergents dans la mucoviscidose. Elles se situent en deuxième rang (après *A. fumigatus*) parmi les champignons filamenteux isolés des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose et présentent une importance particulière en raison de leur diagnostic difficile et de leur très faible sensibilité intrinsèque aux antifongiques (Bernhardt *et al.*, 2013).

La prévalence des *Scedosporium* varie selon les études et selon les méthodes de détection utilisées (Borman *et al.*, 2010). Plusieurs études indépendantes montrent que la prévalence de ces champignons dans la mucoviscidose augmente avec l'utilisation de milieux de culture sélectifs (Rainer *et al.*, 2007b; Horré *et al.*, 2009; Blyth *et al.*, 2010; Masoud-Landgraf *et al.*, 2014; Sedlacek *et al.*, 2015) en lien avec l'inhibition de la croissance de l'*A. fumigatus* qui est souvent associé à ces champignons, facilitant ainsi la détection de *S. apiospermum* dont la croissance est beaucoup plus lente (Figure 17). Dans ce contexte, l'utilisation des géloses YPDA-cycloheximide, DRBC-bénomyl ou encore Sce-Sel+ est donc fortement recommandée pour l'analyse des sécrétions respiratoires des patients. Des approches non-culturelles ont aussi montré leur efficacité pour la détection de *S. apiospermum* dans le contexte de la mucoviscidose, notamment des techniques moléculaires (Nagano *et al.*, 2010 ; Kramer *et al.*, 2015).



**Figure 17 :** Croissance de *Scedosporium aurantiacum* et *Aspergillus fumigatus* sur milieux SABD (Sabouraud-dextrose), Mycosel et SceSel+ (Blyth *et al.*, 2010).

A l'exception de *S. dehoogii*, toutes les espèces du genre *Scedosporium* (*S. apiospermum sensu stricto*, *S. boydii*, *S. aurantiacum*, et *S. minutisporum*) sont capables de coloniser les voies respiratoires des patients CF (Blyth *et al.*, 2010; Bernhardt *et al.*, 2013; Zouhair *et al.*, 2013; Sitterlé *et al.*, 2014). Cependant, la prévalence de chacune de ces espèces dans la mucoviscidose varie selon les études. En France, *S. boydii* est l'espèce la plus fréquemment isolée avec un pourcentage de 62% suivie de *S. apiospermum* (24% des isollements), alors que *S. aurantiacum* représente seulement 10% des isolats et *S. minutisporum* 4% des isolats (Zouhair *et al.*, 2013). En Allemagne, par contre, l'espèce dominante est *S. apiospermum* (49.4%) suivie de *S. boydii* (23,5%) (Bernhardt *et al.*, 2013), tandis qu'en Australie *S. aurantiacum* est largement majoritaire (Blyth *et al.*, 2010).

Même si aucun lien évident n'a été établi jusqu'à présent entre la colonisation à long terme des voies respiratoires et une détérioration clinique ou fonctionnelle, les espèces du genre *Scedosporium* ne sont pas des commensaux des voies respiratoires et, comme pour *A. fumigatus*, la colonisation chronique des voies respiratoires doit contribuer à l'exacerbation de la réaction inflammatoire et donc à la détérioration progressive de la fonction pulmonaire (Giraud et Bouchara, 2014). Dans la plupart des cas rapportés, la colonisation du tractus respiratoire des patients CF par ces champignons était asymptomatique (Pihet *et al.*, 2009). Cependant des cas de mycoses broncho-pulmonaires allergiques (MBPA) ont été rapportés dus à *S. apiospermum* (Cimon *et al.*, 2000) ou à l'association de *S. apiospermum* et d'un *Aspergillus* (Lake *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1993; Kramer *et al.*, 2015). Paugam *et al.* (Paugam *et al.*, 2010) ont montré que les patients colonisés par *S. apiospermum* ont un risque significativement plus élevé de MBPA, ce qui incite à prendre en compte plus particulièrement l'isolement de ce champignon comme facteur de risque de détérioration de la fonction respiratoire. D'autre part, en raison de leur thermotolérance, de leur aptitude à la dissémination en cas de déficit immunitaire et de leur faible sensibilité naturelle aux antifongiques actuels, les espèces du genre *Scedosporium* peuvent être à l'origine de scédosporioses disséminées souvent fatales en cas de transplantation pulmonaire (Castiglioni *et al.*, 2002; Symoens *et al.*, 2006; Sahi *et al.*, 2007; Morio *et al.*, 2010; Hirschi *et al.*, 2012; Thomson *et al.*, 2015). Dans les cas rapportés, les patients ont habituellement développé des infections invasives durant la première année après la transplantation (avec principalement des atteintes pulmonaires, cardiaques, cutanées, oculaires et cérébrales) et sont morts quelques semaines après le diagnostic. La plupart de ces patients étaient colonisés par *S. apiospermum* avant la transplantation, ce qui a amené certains auteurs à considérer qu'une telle colonisation chronique constitue une contre-indication pour la transplantation pulmonaire (Guarro *et al.*, 2006; Parize *et al.*, 2014).

A la manière des *Aspergillus*, les espèces du genre *Scedosporium* sont capables de coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (Defontaine *et al.*, 2002; Morio *et al.*, 2010; Borghi *et al.*, 2010; Lackner *et al.*, 2011; Bernhardt *et al.*, 2013; Zouhair *et al.*, 2013). Dans la plupart de ces études, la technique de RAPD développée par Zouhair *et al.* (Zouhair *et al.*, 2001) a été utilisée pour la caractérisation de la colonisation des voies respiratoires par ces champignons. Ainsi Defontaine *et al.* (Defontaine *et al.*, 2002) ont étudié les isolats provenant de neuf patients atteints de mucoviscidose. Cinq de ces patients ne présentaient qu'un seul génotype. Pour

les autres patients, il s'agissait d'une colonisation chronique par un génotype largement prédominant associé à un ou deux autres génotypes rencontrés de manière transitoire, ou par deux génotypes distincts retrouvés simultanément ou successivement.

De même, cette technique a été utilisée pour la caractérisation des isolats lors d'une infection invasive mortelle suite à une double transplantation pulmonaire chez une femme de 37 ans atteinte de mucoviscidose. Six isolats séquentiels (collectés sur une période de 229 jours après la transplantation) ont été analysés : en dépit du traitement par voriconazole, un génotype unique a été identifié toute au long de cette période, démontrant ainsi la faible activité de ce triazolé sur ces champignons (Morio *et al.*, 2010).

La résistance au voriconazole a également été documentée par le cas décrit par Borghi *et al.* (Borghi *et al.*, 2010) concernant un patient atteint de mucoviscidose, colonisé de manière chronique par *S. apiospermum* et ayant développé par la suite un mycétome pulmonaire. En dépit du traitement, ce patient est décédé avec des signes neurologiques évoquant une atteinte cérébrale. Le typage moléculaire des isolats provenant de ce patient a révélé un génotype unique persistant sur une période de douze mois.

Enfin, plus récemment, Zouhair *et al.* (Zouhair *et al.*, 2013) à la suite des révisions taxonomiques dans le genre *Scedosporium*, ont démontré par RAPD que, comme *S. apiospermum sensu stricto* et *S. boydii*, *S. aurantiacum* et *S. minutisporum* sont capables de coloniser de manière chronique les voies respiratoire des patients.

D'autres techniques moléculaires ont prouvé leur capacité de différenciation infraspécifique et révélé la grande diversité génétique des *Scedosporium* dans le contexte de la mucoviscidose. La technique AFLP a été utilisée pour le typage moléculaire d'isolats cliniques et les résultats obtenus ont confirmé que les voies respiratoires des patients peuvent être colonisées de manière chronique par un génotype unique ou à l'inverse par plusieurs génotypes (Lackner *et al.*, 2011). De même, la MLST a été appliquée à l'analyse de 68 isolats cliniques de *S. apiospermum sensu stricto* et de 47 isolats de *S. boydii*. Cinq loci différents ont été séquencés, *i.e.* les gènes de l'actine (*ACT*), de la calmoduline (*CAL*, exon 3–4), la seconde grande sous-unité de l'ARN polymérase II (*RPB2*), la  $\beta$ -tubuline (*BT2*, exon 2–4) et la manganèse superoxide dismutase (*SOD2*). Les résultats ont révélé une grande diversité au sein de ces deux espèces, avec 8 séquences types (génotypes) détectés pour *S. boydii* (pour 14 patients) et 32 séquences types pour *S. apiospermum* (pour 34 patients). En outre, l'étude a confirmé l'aspect chronique des colonisations respiratoires par les *Scedosporium* (Bernhardt *et al.*, 2013).

La colonisation des voies respiratoires par *S. apiospermum* est vraisemblablement due à l'inhalation de spores aéroportées. Néanmoins, la présence régulière de *S. apiospermum* dans les poumons des patients atteints de mucoviscidose est remarquable par rapport à la rareté de son isolement dans l'air (Guarro *et al.*, 2006; Giraud et Bouchara, 2014). Pour exemple, le genre *Scedosporium* n'a été retrouvé que dans un seul des 130 domiciles investigués à Bruxelles (Belgique), se classant au 49<sup>ème</sup> rang parmi les 52 genres fongiques identifiés (Beguin et Nolard, 1994), et bien d'autres études n'ont pas permis d'isoler ces champignons à partir de prélèvements d'air au domicile des patients (Nagano *et*

*al.*, 2007; Sidot *et al.*, 2007). Un tel écart soulève des questions sur l'origine de la contamination des patients et sur les mécanismes de sélection de ces champignons parmi la grande diversité des moisissures présentes dans l'environnement. Il est possible que ces champignons soient plus abondants dans l'environnement intérieur, mais que les méthodes classiquement utilisées pour leur isolement ne soient pas assez sensibles, et que leur présence ait été masquée dans ces différentes études par d'autres espèces fongiques à croissance plus rapide (Guarro *et al.*, 2006).

### 4.4.3. Espèces du complexe *Rasamsonia argillacea*

En 1999, un premier cas de colonisation des voies respiratoires par une espèce du complexe *R. argillacea* a été rapporté au cours de la mucoviscidose. Les isolats successifs avaient à l'époque été identifiés comme *Penicillium emersonii* sur la base de critères purement morphologiques (Cimon *et al.*, 1999). Néanmoins, une analyse moléculaire rétrospective de ces isolats par séquençage des régions ITS de l'ADNr a permis de rattacher ces isolats au genre *Geosmithia*, appelé par la suite *Rasamsonia*, et 8 autres patients atteints de mucoviscidose diagnostiqués entre 1999 et 2009 comme colonisés par *G. argillacea* ont été signalés en 2010 (Giraud *et al.*, 2010). La même année, 8 autres cas ont été rapportés dans le contexte de la mucoviscidose en Grande-Bretagne (Barton *et al.*, 2010). Depuis, ces champignons ont été régulièrement isolés à partir des expectorations de patients atteints de mucoviscidose dans plusieurs pays européens dont l'Allemagne, les Pays-Bas, l'Autriche, la France et l'Italie. Cependant, seules quelques identifications ou ré-identifications ont été effectuées en tenant compte des dernières mises à jour taxonomiques (Giraud *et al.*, 2013). Plus récemment, 5 cas d'infection par le complexe *R. argillacea* ont été rapportés aux Etats-Unis (Masoud-Landgraf *et al.*, 2014), 7 en Italie (Cariani *et al.*, 2015) et un en Slovénie (Matos *et al.*, 2015).

Plus précisément, trois des quatre espèces du complexe *R. argillacea* sont rencontrées dans le cadre de la mucoviscidose, *R. argillacea sensu stricto*, *R. aegroticola* et *R. piperina* (Giraud *et al.*, 2013; Houbraken *et al.*, 2013; Masoud-Landgraf *et al.*, 2014). De plus, l'analyse d'isolats séquentiels a montré qu'ils appartenaient à une même espèce ce qui suggère que ces champignons peuvent engendrer une colonisation chronique des voies respiratoires, comme les autres espèces fongiques étudiées, qu'il s'agisse d'*A. fumigatus*, d'*A. terreus*, d'*Exophiala dermatitidis* ou encore des espèces du complexe *S. apiospermum*. Cependant, aucune analyse génotypique n'a été réalisée pour étudier la diversité infraspécifique au cours de la colonisation chronique ou lors d'une infection (Giraud *et al.*, 2010; Houbraken *et al.*, 2013).

D'autre part, comme pour les autres espèces fongiques filamenteuses associées à la mucoviscidose, la colonisation des voies respiratoires par les espèces du complexe *R. argillacea* est toujours précédée par des infections bactériennes. Huit des neuf patients rapportés par Giraud *et al.* (Giraud *et al.*, 2010) étaient colonisés de manière chronique par *S. aureus*. Des lésions de l'épithélium bronchique dues à des infections bactériennes chroniques ou à la réponse inflammatoire qui en résulte, seraient nécessaires pour l'implantation des champignons (Cimon *et al.*, 1995).

**TRAVAIL  
EXPERIMENTAL**

### **Étude 1 : Identification et génotypage des espèces du complexe *Scedosporium apiospermum* par analyse des séquences répétitives d'ADN à l'aide du système semi-automatisé DiversiLab®**

(Cette étude ayant été réalisée avant la dernière révision taxonomique dans le genre *Scedosporium*, nous désignerons ici l'ensemble des espèces reconnues à l'époque dans ce genre, à savoir *S. apiospermum*, *S. boydii*, *S. aurantiacum*, *S. dehoogii* et *S. minutisporum*, sous le terme de complexe d'espèces *S. apioerpermum*).

Les espèces du complexe *Scedosporium apiospermum* se situent au deuxième rang des champignons filamenteux isolés des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose (Cystic Fibrosis ou CF) avec une fréquence allant de 4,5% à 11,6% selon les études (Cimon *et al.*, 2000; Horré *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2009; Masoud-Landgraf *et al.*, 2014). La colonisation du tractus respiratoire des patients CF par ces champignons est le plus souvent asymptomatique (Defontaine *et al.*, 2002; Pihet *et al.*, 2009). Néanmoins, des cas de mycoses broncho-pulmonaires allergiques (MBPA) dus à *S. apiospermum* ont été rapportés (Lake *et al.*, 1990; Miller *et al.*, 1993; Cimon *et al.*, 2000; Kramer *et al.*, 2015). D'autre part, en raison de leur thermotolérance, de leur aptitude à la dissémination en cas d'immunodéficience et de leur faible sensibilité naturelle aux antifongiques actuels, les espèces du complexe *S. apiospermum* peuvent être à l'origine de scédosporioses disséminées souvent fatales en cas de transplantation pulmonaire (Castiglioni *et al.*, 2002; Symoens *et al.*, 2006; Sahi *et al.*, 2007; Morio *et al.*, 2010; Hirschi *et al.*, 2012; Thomson *et al.*, 2015). Ces patients ont habituellement développé des infections invasives durant la première année après la transplantation et sont décédés quelques semaines après le diagnostic. La plupart de ces patients étaient colonisés par *S. apiospermum* avant la transplantation, ce qui a amené certains auteurs à considérer qu'une telle colonisation chronique constitue une contre-indication pour la transplantation pulmonaire (Guarro *et al.*, 2006; Parize *et al.*, 2014).

Des révisions taxonomiques récentes ont révélé que *S. apiospermum* et *P. boydii* sont en fait deux espèces distinctes, mais très proches à la fois sur le plan morphologique et phylogénétique. Par ailleurs, trois nouvelles espèces ont été décrites : *S. aurantiacum*, *P. minutispora* et *S. dehoogii* (Gilgado *et al.*, 2005; Gilgado *et al.*, 2008). Par la suite, le principe 'One fungus - One name' a été adopté et donc seul le nom *Scedosporium* est accepté aujourd'hui; ainsi les espèces initialement désignées sous le nom de *Pseudallescheria* sont aujourd'hui dénommées *S. boydii* et *S. minutisporum* (Lackner *et al.*, 2014a).

L'étude de l'épidémiologie des infections respiratoires fongiques au cours de la mucoviscidose a montré qu'à l'exception de *S. dehoogii*, toutes les espèces du complexe *S. apiospermum* sont capables de coloniser de manière chronique les voies respiratoires (Defontaine *et al.*, 2002; Zouhair *et al.*, 2013). Cependant, ces résultats ont été obtenus par la technique de typage RAPD (random amplified polymorphic DNA) qui est considérée comme peu reproductible. D'autre part, un schéma de typage par séquençage de plusieurs loci (MLST) a été proposé pour le génotypage des espèces du complexe *S. apiospermum* (Bernhardt *et al.*, 2013). Récemment, le système semi-automatisé DiversiLab® basé sur



l'analyse de séquences répétitives d'ADN (rep-PCR) a été appliqué avec succès pour la différenciation spécifique et / ou infraspécifique au sein de plusieurs genres de champignons, y compris *Candida*, *Aspergillus* et *Fusarium* (Healy *et al.*, 2004; Healy *et al.*, 2005; Wise *et al.*, 2007). Dans ce contexte, nous avons appliqué cette méthode à l'analyse rétrospective d'isolats multiples ou séquentiels appartenant au complexe *S. apiospermum* provenant d'expectorations prélevées de patients atteints de mucoviscidose. Ces isolats avaient déjà été analysés par RAPD, et les résultats ont été comparés à ceux obtenus par séquençage du gène de la bêta-tubuline et par séquençage multi-loci (*Multi Locus Sequence Typing* ou MLST).

Cette étude a été réalisée sur un panel de 63 isolats multiples ou séquentiels collectés à partir des expectorations provenant de 9 patients atteints de mucoviscidose, isolats qui avaient été étudiés auparavant par RAPD (Defontaine *et al.*, 2002). Ces isolats conservés par lyophilisation dans notre laboratoire avaient initialement été identifiés sur une base morphologique comme appartenant au complexe *S. apiospermum*. Pour cette étude, les 63 isolats ont été remis en culture, l'ADN génomique a été extrait à partir des mycéliums à l'aide du kit DNA Plant mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) et l'identification moléculaire a été réalisée après amplification par PCR d'une partie du gène codant pour la beta-tubuline (*TUB*) telle que décrite par Zouhair *et al.* (2013). Les produits d'amplification ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin extract II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France), puis séquencés dans les deux sens. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été comparées à celles déposées dans la banque de données GenBank à l'aide de l'algorithme BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotide).

Pour l'analyse par rep-PCR, l'ADN génomique a été extrait à partir des mycéliums en utilisant le kit d'extraction MO-BIO Ultraclean preparation kit (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France). L'amplification par PCR des séquences répétitives de l'ADN a été réalisée en utilisant deux kits commercialisés par bioMérieux (Craponne, France) : le kit *Fungal* (anciennement appelé kit *mold*) dont les amorces sont conçues pour l'étude de l'ensemble des champignons filamenteux, et le kit *Aspergillus* dont les amorces sont conçues pour l'étude du genre *Aspergillus*. Par la suite, les amplicons ont été séparés par microélectrophorèse sur séquenceur capillaire Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Calif.). Les similarités entre les profils des isolats étudiés ont été analysées à l'aide du logiciel DiversiLab<sup>®</sup> version 3.4 et les dendrogrammes ont été créés par la méthode UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean).

Pour le séquençage multi-loci, l'analyse a été réalisée comme décrit précédemment par Bernhardt *et al.* (2013) pour tous les isolats de *S. boydii* et *S. apiospermum* ou selon les recommandations de la base des données MLST (<http://mlst.mycologylab.org>) pour les isolats de *S. aurantiacum*. Cinq loci différents ont été séquencés, à savoir les gènes codant l'actine (*ACT*), la calmoduline (*CAL*, exon 3–4), la seconde grande sous-unité de l'ARN polymérase II (*RPB2*), la  $\beta$ -tubuline (*BT2*, exon 2–4) et la manganèse superoxyde dismutase (*SOD2*). Pour les isolats de *S. aurantiacum*, une séquence supplémentaire a été amplifiée dans le gène codant pour le facteur d'élongation 1 alpha (*EF1 $\alpha$* ). D'autre part, pour optimiser l'amplification pour les loci *RPB2* et *BT2* pour *S. apiospermum*, deux paires d'amorces ont

été conçues à partir du génome de la souche de *S. apiospermum* IHEM 14462 (Vandeputte *et al.*, 2014). Les produits d'amplification ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin extract II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) puis séquencés dans les deux sens. Les résultats ont été soumis à la base de données *Fungal MLST Database* et la séquence type (ST) de chaque isolat étudié a été déterminée en combinant les allèles identifiés pour les différents loci cités ci-dessus.

Parmi les 63 isolats étudiés, *S. boydii* était l'espèce la plus représentée avec 36 isolats provenant de 15 expectorations collectées à partir de 4 patients ; *Scedosporium apiospermum sensu stricto* représentaient 21 isolats correspondant à 3 patients. *Scedosporium aurantiacum* (n = 4 isolats) n'a été retrouvée que chez un seul patient. Quant à *Pseudallescheria ellipsoidea* (n = 2), une sous-espèce de *S. boydii*, il n'a été retrouvé que chez un seul patient lui aussi.

L'analyse des 63 isolats par rep-PCR et le traitement de leurs profils électrophorétiques avec le logiciel DiversiLab ont clairement différencié les trois espèces quel que soit le kit rep-PCR utilisé. De plus, cette analyse a également permis la différenciation des souches au sein d'une même espèce. L'utilisation du kit *Fungal* a toujours généré un nombre plus important de bandes électrophorétiques. Dès lors, ce kit était plus discriminant que le kit *Aspergillus* et donnait des résultats cohérents avec ceux obtenus par RAPD et MLST. L'utilisation du kit *Aspergillus* a permis d'identifier 8 génotypes différents sur l'ensemble des isolats cliniques, comparé aux 9 génotypes obtenus avec le kit *Fungal*.

Pour *S. boydii*, l'analyse rep-PCR avec le kit *Aspergillus* ne permettait pas de différencier les isolats de cette espèce et donnait toujours le même profil électrophorétique. En revanche, la rep-PCR avec le kit *Fungal* s'est avérée plus performante, en produisant des résultats en accord avec ceux de la MLST. En effet, avec ces deux techniques, chaque patient s'est révélé colonisé par un génotype unique, différent d'un patient à l'autre. Les résultats de la RAPD ont été semblables, 3 patients étaient colonisés par un génotype unique différent d'un patient à l'autre, et le quatrième patient été colonisé par un génotype dominant associé à deux autres génotypes isolés une seul fois chacun. D'autre part, les deux isolats de *P. ellipsoidea* n'ont pas été analysés par MLST. Ces deux isolats provenant d'un même patient appartenaient au même génotype que ce soit par rep-PCR ou par RAPD. Concernant *S. apiospermum sensu stricto*, deux patients étaient colonisés par un génotype unique et patient-spécifique, que ce soit par RAPD, par MLST ou par rep-PCR indépendamment du kit utilisé. Le troisième patient été colonisé par deux génotypes différents d'après les résultats de RAPD, comme en MLST ou rep-PCR avec le kit *Fungal*. Avec le kit *Aspergillus*, trois génotypes ont été identifiés pour ce patient. Enfin, pour *S. aurantiacum*, les 4 isolats ont le même profil électrophorétique quel que soit le kit rep-PCR utilisé ; ils appartenaient au même génotype RAPD et présentaient la même séquence type MLST.

L'identification précise des espèces au sein du complexe *S. apiospermum* est non seulement importante pour étudier l'épidémiologie de la colonisation des voies respiratoires et des infections respiratoires, mais elle est également cruciale d'un point de vue thérapeutique du fait de la différence de virulence et de sensibilité aux antifongiques entre

ces espèces. Cette étude confirme l'utilité de la rep-PCR pour l'identification précise des espèces du complexe *S. apiospermum* isolées chez des patients atteints de mucoviscidose (Steinmann *et al.*, 2011). En plus, nous avons également démontré que cette méthode peut être utilisée pour la différenciation infraspécifique, au moins les deux espèces majeures de ce complexe d'espèces.

Les données de la rep-PCR obtenues avec le système semi-automatisé DiversiLab ont été comparées aux génotypes précédemment obtenus par RAPD et aux séquences types MLST déterminées dans ce travail. Une grande cohérence a été trouvée entre les résultats de ces trois techniques de typage quand le kit *Fungal* était utilisé pour la rep-PCR. Sur l'ensemble des isolats de *S. apiospermum* et *S. boydii*, 8 génotypes ont été différenciés par rep-PCR et MLST par rapport à 10 par RAPD. Tous les isolats de *S. aurantiacum* ont partagé le même génotype RAPD et ont présenté le même profil de rep-PCR et la même séquence type MLST. La majorité des patients étaient colonisés par un génotype unique, propre à chaque patient, ce qui confirme la capacité des espèces du complexe *S. apiospermum* à coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose et leur persistance en dépit des traitements antifongiques (Bernhardt *et al.*, 2013; Zouhair *et al.*, 2013).

En guise de conclusion, les résultats montrent l'efficacité de la rep-PCR aussi bien pour la différenciation spécifique des espèces du complexe *S. apiospermum* que pour leur différenciation infraspécifique.

Article original 1

**Semi-automated repetitive sequence-based PCR amplification for species of the *Scedosporium apiospermum* complex**

Published in *Medical Mycology*, 2015, 00, 1–11 (doi:10.1093/mmy/myv080)

Received 13 April 2015; Revised 17 July 2015; Accepted 23 July 2015

Olivier Matray<sup>1,2</sup>, Abdelmounaim Mouhajir<sup>3,4</sup>, Sandrine Giraud<sup>3</sup>, Charlotte Godon<sup>3</sup>, Gilles Gargala<sup>1</sup>, Franck Labbé<sup>1</sup>, Amandine Rougeron<sup>3,5</sup>, Jean-Jacques Ballet<sup>1</sup>, Rachid Zouhair<sup>4</sup>, Jean-Philippe Bouchara<sup>3,5</sup> and Loïc Favennec<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> EA 3800, Université de Rouen, 76031 Rouen, France, <sup>2</sup> Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, CHU Charles-Nicolle, 76031 Rouen, France, <sup>3</sup> L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, EA 3142, 49933 Angers, France, <sup>4</sup> Department of Biology, Faculty of Sciences, University Moulay Ismail, Meknes, Morocco, <sup>5</sup> Centre Hospitalier Universitaire, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Institut de Biologie en Santé-PBH, 49933 Angers, France

The first two authors equally contributed to this work. Likewise, the last two authors also equally contributed to this study.

Address correspondence to Loïc Favennec, loic.favennec@chu-rouen.fr

**The *Scedosporium apiospermum* species complex usually ranks second among the filamentous fungi colonizing the airways of patients with cystic fibrosis (CF), but little is known about the epidemiology of the airway colonization. PCR amplification of repetitive sequences (rep-PCR) was applied to the retrospective analysis of a panel of isolates already studied by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and comprising 63 isolates recovered from sputa from 9 CF patients. Results were compared to those obtained previously by RAPD, and herein by beta-tubulin (*TUB*) gene sequencing and Multilocus Sequence Typing (MLST). Within the panel of isolates studied, *S. apiospermum sensu stricto* and *Scedosporium boydii*, as expected, were the predominant species with 21 and 36 isolates, respectively. Four isolates from one patient were identified as *Scedosporium aurantiacum*, whereas two isolates belonged to the *Pseudallescheria ellipsoidea* subgroup of *S. boydii*. rep-PCR analysis of these isolates clearly differentiated the three species and *P. ellipsoidea* isolates, whatever the rep-PCR kit used, and also permitted strain differentiation. When using the mold primer kit, results from rep-PCR were in close agreement with those obtained by MLST. For both *S. apiospermum* and *S. boydii*, 8 genotypes were differentiated by rep-PCR and MLST compared to 10 by RAPD. All *S. aurantiacum* isolates shared the same RAPD genotype and exhibited the same rep-PCR profile and sequence type. These results illustrate the efficacy of rep-PCR for both species identification within the *S. apiospermum* complex and genotyping for the two major species of this complex.**

Abstract presentation: Part of this work was presented during the 18th Congress of the International Society for Human and Animal Mycology, Berlin (Germany), June 2012.

**Key words:** *Scedosporium apiospermum* species complex, Cystic fibrosis, Species identification, Genotyping, rep-PCR.

### Introduction

Prognosis in cystic fibrosis (CF), the major inherited disease in the Caucasian population, mainly depends on the severity of the lesions of the lungs. Because of the thickening of the bronchial mucus and of the impairment of the mucociliary clearance, the respiratory tract of CF patients is often colonized by various microorganisms, sometimes leading to respiratory infections which are the major cause of morbidity and mortality in this context [1]. Considerable attention has been paid during the past decades to the prevention and treatment of bacterial respiratory infections, and progress in this field resulted in a marked increase in life expectancy [2]. Nevertheless, continued improvement in life expectancy requires a better knowledge of the causative agents of these infections and greater attention should be paid to non-bacterial pathogens, especially fungi [3].

With a frequency ranging from 4.5% to 11.6%, *Scedosporium apiospermum* which was initially considered the anamorph of *Pseudallescheria boydii*, usually ranks second among the filamentous fungi colonizing the CF airways, after *Aspergillus fumigatus* [4-7]. In CF, this fungal colonization may result in endobronchitis and allergic broncho-pulmonary mycoses [4, 8]. Moreover, it may compromise the success of lung transplantation due to the capacity of the fungus to cause severe and often fatal disseminated infections in immunocompromised individuals [9-11] and to the limited efficacy of current antifungals [12-14].

Limited information is presently available regarding the natural history of the airway colonization by *S. apiospermum* in CF. Recent taxonomic studies revealed that *S. apiospermum* and *P. boydii* are two distinct species, and three additional species were identified [15-17]. Therefore, *S. apiospermum* is now considered a species complex comprising five distinct species, namely *Scedosporium apiospermum sensu stricto*, *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium dehoogii*, *P. boydii* (including the *Pseudallescheria ellipsoidea* subgroup) and *Pseudallescheria minutispora* which are now called *Scedosporium boydii* and *Scedosporium minutisporum* [18]. Regarding the molecular epidemiology of airway colonization / respiratory infections in CF, it was shown that apart from *S. dehoogii* which has never been reported in respiratory diseases, all these fungi are usually responsible for a chronic colonization of the airways [19, 20]. However, these results were obtained by random amplification of polymorphic DNA (RAPD) which is considered a poorly reproducible method. A multi-locus sequence typing (MLST) scheme has been proposed for genotype studies, based on the sequencing of five distinct loci [21]. Recently, the semi-automated DiversiLab system based on PCR amplification of repetitive sequences (rep-PCR) followed by separation of the amplified products by capillary electrophoresis has been successfully applied to species identification in various fungal groups including *Candida* yeasts, *Aspergillus* and *Fusarium* species [22-24], as well as to strain differentiation within *Candida* and *Aspergillus* species [23, 25]. Here this method was applied to the retrospective analysis of multiple or sequential isolates belonging to the *S. apiospermum* species complex recovered from sputum samples collected from CF patients, and previously analyzed by RAPD, and results were compared to those obtained by beta-tubulin gene sequencing and MLST.

### Materials and Methods

#### *Microorganisms and culture conditions*

This study was performed using a panel of 63 multiple (from the same clinical sample) or sequential (from successive samples from the same patient) isolates recovered from sputum samples collected from 9 CF patients, and previously studied by RAPD [20] (Table 1). Among this set of isolates, RAPD differentiated 12 genotypes; a unique genotype was found for seven patients, while one patient (Patient P1) exhibited a largely dominant genotype associated with two others, each found only once, and two distinct genotypes were detected successively, but once associated, for the last patient (Patient P8). No genotypes were shared by the patients. These isolates preserved by freeze-drying in our laboratory were initially identified on a morphological basis as belonging to the *S. apiospermum* complex. Additionally, the type strain of *S. minutisporum* 21148, isolated from sediments from the Tordera river (Barcelona, Spain) [15] and obtained from the Institute of Hygiene and Epidemiology-Mycolology section (IHEM) culture collection (Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium) was included in our set of isolates. Isolates were cultivated on yeast extract-peptone-dextrose (YPD) agar (containing in g/L: yeast extract, 5; peptone, 10; glucose, 20; and agar, 20) plates supplemented with 0.5 g/L chloramphenicol. After incubation (7 days, 37°C), the mycelium was scraped and inoculated in YPD broth. Cultures were incubated for 10 days at 37°C. Finally the fungal malt was harvested, and ground with a mortar and pestle in liquid nitrogen.

#### *Repetitive sequence-based PCR*

Fungal DNA was extracted from ground mycelium using the MO-BIO Ultraclean preparation kit (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France). DNA was quantified at 260 nm using a Nanodrop spectrophotometer (NanoDrop technologies, Wilmington, DE). Repetitive DNA sequences were amplified by PCR using two primer sets from bioMérieux (Craponne, France): the Mold DNA fingerprinting primer kit proposed for the analysis of all mold species, and the *Aspergillus*-specific DNA fingerprinting primer kit which uses primers specifically designed for *A. fumigatus*. Amplicons were separated by capillary electrophoresis and electrophoretic profiles were compared using the DiversiLab Healthcare software version 3.41 (bioMérieux). Phylogenetic trees were established using the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA). The interpretative criteria provided by the manufacturer led us to categorize the isolates as indistinguishable, closely related or different (DiversiLab user's guide). Isolates with electrophoretic profiles differing by at least three peaks were categorized as different. Isolates were categorized as indistinguishable and belonging to the same genotype when they shared the same electrophoretic profile, and isolates with electrophoretic profiles differing by one or two bands were categorized as closely related. Rep-PCR genotypes were numbered according to their order in the phylogenetic trees.

**Table 1.** Isolates studied and their rep-PCR genotypes compared to previously determined RAPD genotypes and to herein identified MLST sequence types.

Patient number <sup>1</sup>	Sampling date (yyyy/mm/dd)	IHEM number	RAPD genotype <sup>1</sup>	MLST ST	rep-PCR genotype		Species identification	Genbank accession number <sup>2</sup>
					Mold kit	<i>Aspergillus</i> kit		
P1	1998/01/09	14263	1	10	3	5	<i>S. boydii</i>	AJ889990
		14264	1	10	3	5	<i>S. boydii</i>	KC812533
		14266	1	10	3	5	<i>S. boydii</i>	KC812534
		14267	1	10	3	5	<i>S. boydii</i>	KC812535
	1998/02/16	14369	1	10	3	5	<i>S. boydii</i>	KC812536
	1998/03/10	14457	1	10	3	5	<i>S. boydii</i>	KC812537
	1998/06/10	14638	2	10	3	5	<i>S. boydii</i>	AJ889998
	1998/07/31	14756	1	10	3	5	<i>S. boydii</i>	KC812538
		14758	3	10	3	5	<i>S. boydii</i>	AJ890000
		14759	1	10	3	5	<i>S. boydii</i>	KC812539
	1998/09/04	15142	1	10	3	5	<i>S. boydii</i>	KC812540
	1999/01/13	15582	1	10	3	5	<i>S. boydii</i>	KC812541
		15583	1	10	3	5	<i>S. boydii</i>	KC812542
P2	1999/01/13	49900353/1 <sup>3</sup>	4	/	7	8	<i>P. ellipsoidea</i>	KC812543
		49900353/2 <sup>3</sup>	4	/	7	8	<i>P. ellipsoidea</i>	KC812544

**Table 1 (continued).** Isolates studied and their rep-PCR genotypes compared to previously determined RAPD genotypes and to herein identified MLST sequence types.

Patient number <sup>1</sup>	Sampling date (yyyy/mm/dd)	IHEM number	RAPD genotype <sup>1</sup>	MLST ST	rep-PCR genotype		Species identification	Genbank accession number <sup>2</sup>
					Mold kit	<i>Aspergillus</i> kit		
P3	1998/02/24	14452	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812545
		14453	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812546
		14455	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812547
	1998/05/26	14624	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812548
		14626	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812549
		14627	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812550
	1998/06/06	14628	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812551
		14629	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812552
		14631	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812553
		14632	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812554
	1998/06/15	14633	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812555
		14634	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812556
		14635	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812557
		14636	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812558
	1998/11/09	14637	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812559
		15464	5	3	4	5	<i>S. boydii</i>	KC812560



**Table 1 (continued).** Isolates studied and their rep-PCR genotypes compared to previously determined RAPD genotypes and to herein identified MLST sequence types.

Patient number <sup>1</sup>	Sampling date (yyyy/mm/dd)	IHEM number	RAPD genotype <sup>1</sup>	MLST ST	rep-PCR genotype		Species identification	Genbank accession number <sup>2</sup>
					Mold kit	<i>Aspergillus</i> kit		
P4	1998/01/08	14268	6	37	8	3	<i>S. apiospermum</i>	AJ889991
		14269	6	37	8	3	<i>S. apiospermum</i>	KC812561
		14270	6	37	8	3	<i>S. apiospermum</i>	KC812562
	1998/01/21	14273	6	37	8	3	<i>S. apiospermum</i>	KC812563
		14275	6	37	8	3	<i>S. apiospermum</i>	KC812564
		14276	6	37	8	3	<i>S. apiospermum</i>	KC812565
		1999/02/15	15643	6	37	8	3	<i>S. apiospermum</i>
P5	1998/09/22	15149	8	39	9	4	<i>S. apiospermum</i>	AJ890002
		15151	8	39	9	4	<i>S. apiospermum</i>	KC812567
P6	1998/10/26	15458	9	47	2	6	<i>S. aurantiacum</i>	AJ890135
		15459	9	47	2	6	<i>S. aurantiacum</i>	KC812568
		15460	9	47	2	6	<i>S. aurantiacum</i>	KC812569
		15461	9	47	2	6	<i>S. aurantiacum</i>	KC812570
P7	1998/01/19	14357	10	11	6	5	<i>S. boydii</i>	KC812571
	1998/09/22	15545	10	11	6	5	<i>S. boydii</i>	KC812572

**Table 1 (continued).** Isolates studied and their rep-PCR genotypes compared to previously determined RAPD genotypes and to herein identified MLST sequence types.

Patient number <sup>1</sup>	Sampling date (yyyy/mm/dd)	IHEM number	RAPD genotype <sup>1</sup>	MLST ST	rep-PCR genotype		Species identification	Genbank accession number <sup>2</sup>
					Mold kit	<i>Aspergillus</i> kit		
P8	1998/03/04	14462	11	38	10	1	<i>S. apiospermum</i>	AJ889995
		14463	11	38	10	2	<i>S. apiospermum</i>	KC812573
		14465	11	38	10	1	<i>S. apiospermum</i>	KC812574
	1998/08/11	14762	12	36	11	4	<i>S. apiospermum</i>	KC812575
		14763	12	36	11	4	<i>S. apiospermum</i>	KC812576
		14764	12	36	11	4	<i>S. apiospermum</i>	KC812577
	1998/09/22	15146	12	36	11	4	<i>S. apiospermum</i>	KC812578
		15148	12	36	11	4	<i>S. apiospermum</i>	KC812579
	1998/11/10	15551	12	36	11	4	<i>S. apiospermum</i>	KC812580
		15552	12	36	11	4	<i>S. apiospermum</i>	KC812581
		15553	11	38	10	4	<i>S. apiospermum</i>	KC812582
	1998/12/03	15555	12	36	11	4	<i>S. apiospermum</i>	KC812583

**Table 1 (continued).** Isolates studied and their rep-PCR genotypes compared to previously determined RAPD genotypes and to herein identified MLST sequence types.

Patient number <sup>1</sup>	Sampling date (yyyy/mm/dd)	IHEM number	RAPD genotype <sup>1</sup>	MLST ST	rep-PCR genotype		Species identification	Genbank accession number <sup>2</sup>
					Mold kit	<i>Aspergillus</i> kit		
P9	1998/02/16	14358	15	12	5	5	<i>S. boydii</i>	<i>AJ889993</i>
		14359	15	12	5	5	<i>S. boydii</i>	KC812584
		14360	15	12	5	5	<i>S. boydii</i>	KC812585
		14361	15	12	5	5	<i>S. boydii</i>	JQ691025
		14362	15	12	5	5	<i>S. boydii</i>	KC812586
Environment <sup>4</sup>	1991	21148	/	/	1	7	<i>S. minutisporum</i>	<i>AJ890122</i>

<sup>1</sup>Patient numbers and RAPD genotypes as previously published [20].

<sup>2</sup>Accession numbers correspond to the nucleotide sequence of TUB region of the beta-tubulin gene which was sequenced for all isolates in this work, except italicized numbers which correspond to TUB sequences deposited in Genbank by Gilgado *et al.* [15].

<sup>3</sup>Isolates not deposited at the IHEM culture collection and designated by Angers University Hospital (Angers, France) identification number.

<sup>4</sup>Type strain of *S. minutisporum* (also called FMR 4072) isolated in 1991 from sediment from Tordera river (Barcelona, Spain) and identified as *S. minutisporum* by Gilgado *et al.* [15].

### *Species identification within the S. apiospermum complex*

Molecular identification was performed as described by Zouhair *et al.* [19] by PCR amplification of part of the beta-tubulin gene (*TUB*). Amplified products were purified using the NucleoSpin extract II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and commercially sequenced in both directions. The obtained sequences were analyzed by individual BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) searches using the NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST database. Ninety-nine to 100% sequence similarities to isolates FMR 8630, FMR 4072, FMR 8535, FMR 8537 and FMR 7884 analyzed by Gilgado *et al.* [15] were used to identify the present isolates as *S. aurantiacum*, *S. minutisporum*, *S. apiospermum*, *S. boydii* and *P. ellipsoidea*, respectively. All sequences were deposited in the Genbank database under the accession numbers indicated in Table 1.

### *Multilocus Sequence Typing (MLST)*

All *S. boydii* not including *P. ellipsoidea* (n = 36), *S. apiospermum* (n = 21) and *S. aurantiacum* isolates (n = 4) were analyzed by MLST as previously described by Bernhardt *et al.* [21] or according to recommendations of the Fungal MLST Database (<http://mlst.mycologylab.org/>) for *S. aurantiacum* isolates. For all the isolates, DNA was amplified by PCR using five primer pairs targeting part of the genes encoding actin (*ACT*), calmodulin (*CAL*, exon 3–4), the second largest subunit of RNA polymerase II gene (*RPB2*),  $\beta$ -tubulin (*BT2*, exon 2–4) and the manganese superoxide dismutase (*SOD2*). Moreover, for *S. aurantiacum* isolates, an additional sequence in the elongation factor 1 alpha (*EF1 $\alpha$* ) gene was amplified. In addition, to optimize the amplification of *RPB2* and *BT2* loci for *S. apiospermum* isolates, two new primer pairs were designed from the whole genome sequence of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 [26]: *RPB2*-5F 5'-GACGACCGTGATCACTTTGG-3' and *RPB2*-7R 5'-CCCATGGCTGACTGGTAA-3' for *RPB2* and *BT2a* 5' GGAAACCAAATTGGTGCTGCCTTC-3' and *BT2b* 5'-ACCCTCTGTGTAGTGACCCTTGGC-3' for *BT2* amplification. Amplified products were purified using the NucleoSpin extract II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and commercially sequenced in both directions. Sequencing analysis was performed using the BioEdit sequence Alignment Editor (version 7.1.11) and the sequences were trimmed as previously described by Bernhardt *et al.* [21]. The sequence type (ST) of each isolate was defined by the combination of alleles identified at the different loci studied. All obtained data were submitted to the Fungal MLST Database.

### Results

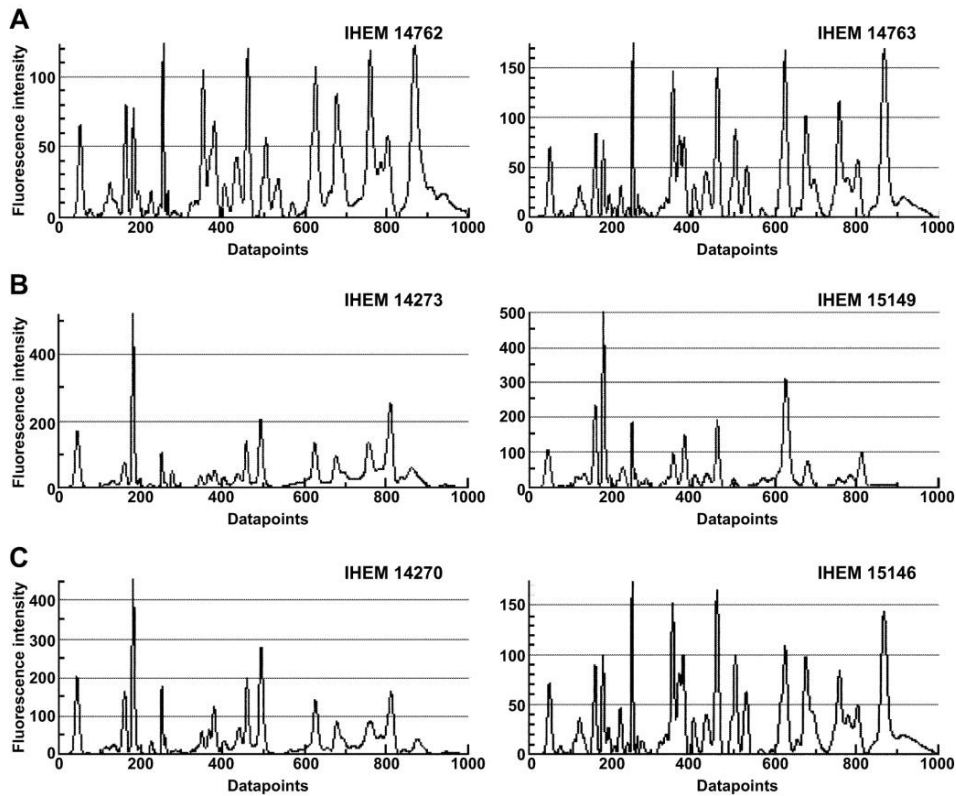
#### *Species identification within the S. apiospermum Complex*

TUB sequencing was used for precise species identification within the *S. apiospermum* complex. *Scedosporium boydii* was the most common species with a total number of 36 isolates recovered from 15 sputum samples collected from patients P1, P3, P7, and P9, whereas *S. apiospermum* was identified from three patients (P4, P5, and P8), representing 21 isolates (Table 1). All isolates from patient P6 were identified by TUB sequencing as *S. aurantiacum*, whereas the two isolates studied for patient P2 were reassigned to the *P. ellipsoidea* subgroup of *S. boydii*. *Scedosporium minutisporum* was not recovered from the nine CF patients studied here, and none of the patients was colonized by two distinct species.

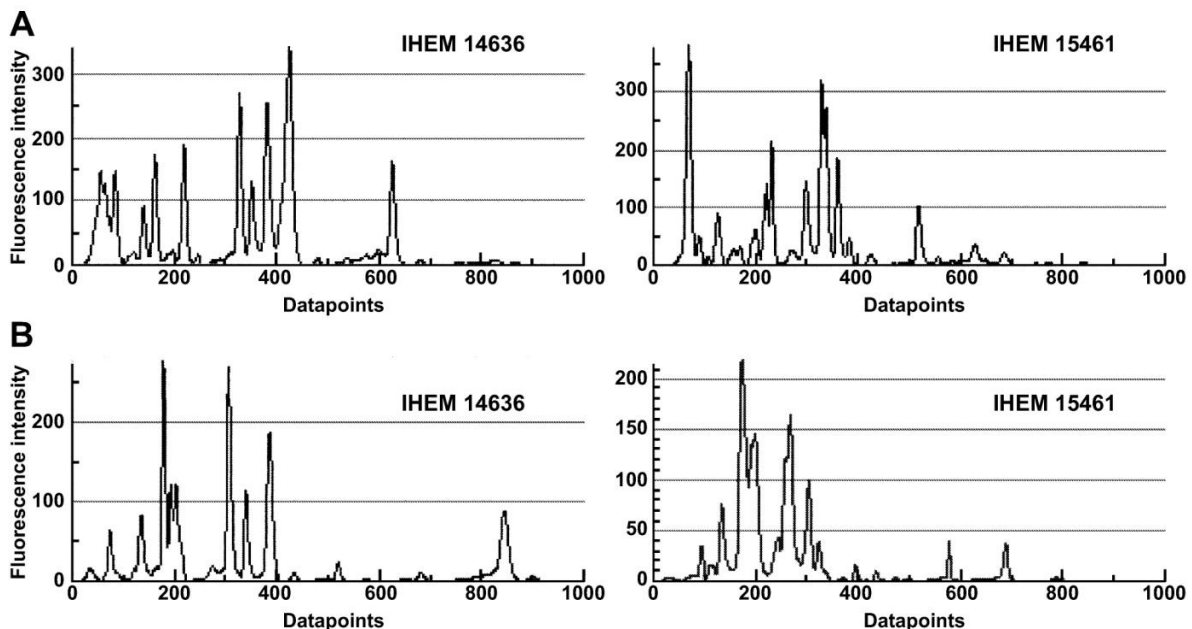
#### *Performances of Mold and Aspergillus rep-PCR assays and criteria for strain comparison*

rep-PCR was conducted on our set of isolates using two primer kits designed to amplify all mold species (MoldDNA fingerprinting primer kit) or more specifically *A. fumigatus* (*Aspergillus*-specific DNA fingerprinting primer kit), and from the obtained electrophoretic profiles, the isolates were categorized as indistinguishable, closely related or different according to the interpretative criteria provided by the manufacturer. An example of isolates sharing the same electrophoretic profile and therefore belonging to the same rep-PCR genotype is presented in Figure 1A with *S. apiospermum* IHEM 14762 and 14763 isolates obtained from the same sputum sample from patient P8. Figure 1B shows an example of closely related isolates, that is, differing only by 1 or 2 peaks, with *S. apiospermum* IHEM 14273 and 15149 isolates from patients P4 and P5, respectively, and an example of isolates with -electrophoretic profiles differing by at least three peaks, therefore belonging to different genotypes, is shown in Figure 1C, with *S. apiospermum* IHEM 14270 and 15146 isolates recovered from patients P4 and P8, respectively.

The use of the Mold primer kit always resulted in the detection of a greater number of electrophoretic bands as shown for *S. boydii* IHEM 14636 and *S. aurantiacum* IHEM 15461 isolates presented as typical examples (Fig. 2). Moreover, this kit was more discriminant than the *Aspergillus*-specific primer kit. Seven different profiles were obtained for the whole set of clinical isolates using the *Aspergillus*-specific primer kit, compared to 10 genotypes identified with the Mold primer kit (Table 1). Finally, as no *S. minutisporum* isolates were detected among the clinical isolates studied here, an environmental isolate was analyzed by rep-PCR, which clearly differentiated this isolate from the others.



**Figure 1.** Typical examples of electrophoretic profiles obtained by rep-PCR using the Mold DNA fingerprinting primer kit. **(A)** identical profiles (*S. apiospermum* IHEM 14762 and 14763 isolates); **(B)** closely related profiles (*S. apiospermum* 14273 and 15149 isolates); and **(C)** distinct profiles (*S. apiospermum* IHEM 14270 and 15146 isolates).



**Figure 2.** Comparison of electrophoretic profiles generated using the Mold DNA fingerprinting primer kit **(A)** or with the *Aspergillus*-specific fingerprinting primer kit **(B)**. Electrophoretic profiles obtained for *S. boydii* IHEM 14636 and *S. aurantiacum* IHEM 15461 isolates are shown as examples.

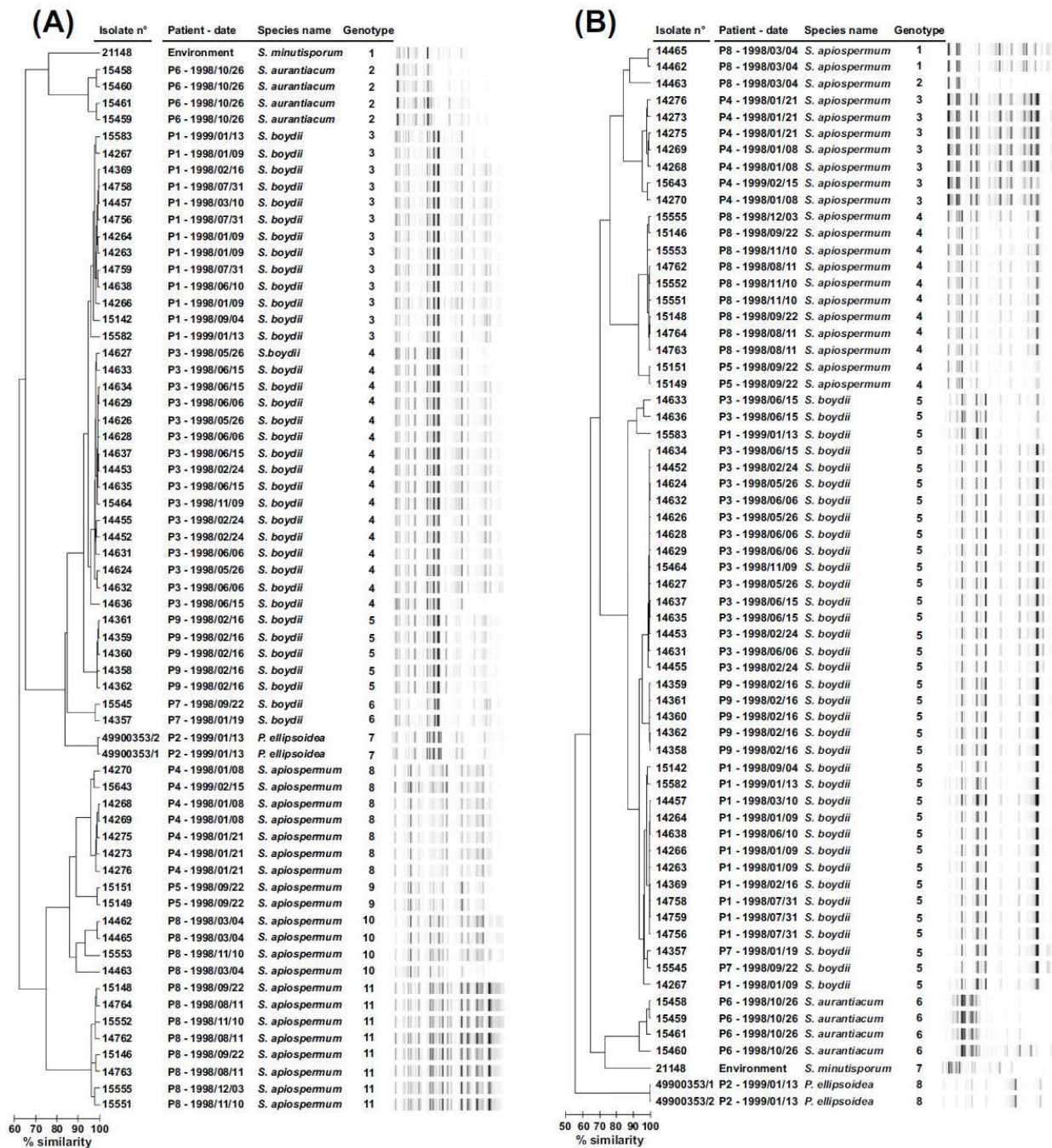
In addition, data were analyzed using the DiversiLab software, which generates dendrograms showing fingerprint similarities between the isolates. All isolates from the same species were clustered in the dendrogram generated from data obtained with the Mold primer kit (Fig. 3A) as well as using the *Aspergillus*-specific primer kit (Fig. 3B). With both primer kits, two groups of isolates were distinguished within *S. apiospermum sensu stricto*. However, compared to the Mold primer kit, the use of the *Aspergillus*-specific primer kit separated the species in a slightly different order. For instance, whereas the two *P. ellipsoidea* isolates were clustered with the other *S. boydii* isolates with the Mold primer kit, they were clearly separated from the other *S. boydii* isolates when using the *Aspergillus*-specific primer kit (Fig. 3B).

### *Comparison of rep-PCR with MLST and RAPD for strain differentiation*

Compared to the *Aspergillus*-specific primer kit, the use of the mold primer kit provided results more consistent with those obtained by RAPD and MLST (Table 1). For example, the *Aspergillus* rep-PCR assay could not differentiate the *S. boydii* isolates, always producing for these isolates the same electrophoretic profile. In contrast, results obtained using the Mold primer kit were in close agreement with those obtained by MLST. Using this kit, rep-PCR showed that patients P3, P7 and P9 were each colonized by a single genotype, differing from one patient to another, as demonstrated by RAPD and MLST. Conversely, while three genotypes were identified by RAPD for patient P1 with a largely dominant genotype (11 isolates) associated with two other genotypes very close to the dominant genotype and found only once each, single electrophoretic profile and sequence type were seen by rep-PCR and MLST for all isolates from this patient.

Regarding *S. apiospermum sensu stricto*, patients P4 and P5 were also colonized each by a single strain as suggested by rep-PCR, which was confirmed by RAPD and MLST. By contrast, two distinct rep-PCR genotypes were found successively in sputum samples from patient P8 using the Mold primer kit, with at first a transient carriage of Mold rep-PCR genotype 10 unable to establish within the respiratory tract, followed by a chronic colonization of the airways by Mold rep-PCR genotype 11, and a similar evolution was revealed by RAPD and MLST. Likewise, three distinct electrophoretic profiles were seen with the *Aspergillus*-specific primer kit for the four isolates belonging to MLST sequence type 38. Moreover, using the *Aspergillus*-specific primer kit, the same electrophoretic profile was seen for patient P5's isolates and most of the isolates from patient P8, whereas the use of the Mold primer kit clearly differentiated the isolates from these two patients, in agreement with the results obtained by RAPD and MLST.

Four *S. aurantiacum* isolates originating from the same sputum sample from patient P6 were also studied. Whatever the rep-PCR primer kit used, these isolates shared the same electrophoretic profile and therefore belonged to the same genotype, in agreement with the results obtained by RAPD and MLST. Moreover, as they belonged to the *P. ellipsoidea* subgroup of *S. boydii*, the two isolates studied for patient P2 were not analyzed by MLST. Nevertheless, in agreement with results from RAPD, both isolates were shown to belong to the same genotype by rep-PCR.



**Figure 3.** Phylogenetic tree generated from the analysis of data obtained with the Mold DNA fingerprinting primer kit (A) or with the *Aspergillus* specific fingerprinting primer kit (B). Data were analyzed with the unweighted pair group method with arithmeticmean (UPGMA) using the DiversiLab Healthcare software and genotypes were numbered according to their order in the phylogenetic trees. The type strain of *S. minutisporum* (IHEM strain 21148, also called FMR 4072) was included in the panel of isolates studied.



### Discussion

In most cases, the airway colonization by species of the *S. apiospermum* complex in CF is asymptomatic [3, 4]. However, even in the absence of an obvious respiratory infection, careful attention is required in case of chronic colonization of the airways, because of the propensity of these fungi to disseminate in lung transplant recipients [9-11] and of their primary resistance to echinocandins and very low susceptibility to current triazole drugs [12-14]. Additionally, there is now accumulating evidence indicating that persistent carriage of fungi in CF patients without clinical signs of respiratory infection is a risk factor for a progressive worsening of the lung function [27-29]. Compared to non-colonized patients and transient carriers, the chronic colonization of the airways by *A. fumigatus* or *Candida albicans* is an independent risk factor for a decline in the forced expiratory volume in one second (FEV<sub>1</sub>) and hospital-treated exacerbations in CF [27-29]. Therefore an early and accurate detection of fungi appears essential for appropriate treatment.

Since the works of Gilgado *et al.* [15-17], *S. apiospermum* is considered a species complex comprising five distinct species, four of them having been identified in the CF context: *S. apiospermum sensu stricto*, *S. boydii*, *S. aurantiacum* and *S. minutisporum* [19]. The precise species identification within the *S. apiospermum* complex is important not only for a better knowledge of the epidemiology of airway colonization / clinical infections, but also because of differences between species in their susceptibility to antifungals and pathogenicity [12-14, 30]. However, precise species identification is not possible on a morphological basis. Several molecular methods allowing the detection of the *S. apiospermum* complex from respiratory secretions and, for some of them, direct species identification, have been described such as quantitative real-time PCR, PCR-based reverse line blot hybridization and loop-mediated isothermal amplification [31]. Nevertheless, these methods are not commercially available and therefore uneasy to use in routine practice. A rapid and accurate species differentiation from positive cultures may be reached by matrix-assisted LASER desorption ionization time-of-flight / mass spectrometry, but until now validated databases for identification of these closely related species are available for the Andromas system only [32, 33]. In addition, genotyping of the isolates is required to distinguish between a regular, but transient carriage of distinct genotypes, which is not clinically relevant, from a chronic colonization of the airways which may be associated with a clinical or functional worsening as demonstrated for the chronic colonization of the airways by *C. albicans* or *A. fumigatus* [27-29], and none of the above mentioned methods allows this strain delineation.

In the present study, rep-PCR permitted precise species identification of clinical isolates from CF patients within the *S. apiospermum* complex as previously shown for the two major species of this complex, *i.e.* *S. apiospermum sensu stricto* and *S. boydii* [34]. In addition we also demonstrated that this method may be used for strain delineation within this species complex, at least for the two major species. Species identification and strain delineation were found easier using the Mold DNA fingerprinting primer kit than the *Aspergillus*-specific primer kit, which always produced lower peak numbers and was less discriminant.

rep-PCR data obtained with the semi-automated system DiversiLab were compared with previously obtained RAPD genotypes and with the herein identified MLST sequence types using the same set of isolates initially identified on a morphological basis as belonging to the *S. apiospermum* species complex [20]. In parallel, precise species identification was conducted by TUB sequencing. Interestingly, rep-PCR data were consistent with species identification and a close agreement was shown for strain differentiation between rep-PCR and MLST. Dendrogram analysis of the data generated with the Mold primer kit revealed a clustering very close to that reported by Gilgado *et al.* [15]. Interestingly, species clustered in a different order using the *Aspergillus*-specific primer kit, with the two *P. ellipsoidea* isolates clearly separated from the other *S. boydii* isolates. rep-PCR thus provides new experimental data reviving the debate about the species status of *P. ellipsoidea* [18].

From previous analysis of our set of isolates by RAPD, it was suggested that CF patients are usually colonized by a single genotype conserved over time despite the antifungal therapy [20]. Whatever the species within the *S. apiospermum* complex, a single genotype different from one patient to another was continuously present in almost all patients during their follow-up, and this was confirmed by rep-PCR and MLST. Patient P1 was shown by RAPD to be colonized by a largely dominant genotype associated with two other genotypes very close to the dominant genotype and found only transiently [20]. Interestingly, single electrophoretic profile and sequence type were seen by rep-PCR and MLST for all isolates from patient P1. By contrast, two distinct RAPD genotypes were found successively in sputum samples from patient P8, with at first a transient carriage of RAPD genotype 11 unable to establish within the respiratory tract, followed by a chronic colonization of the airways by RAPD genotype 12 [20], and a similar evolution was revealed here by rep-PCR and MLST.

Genotyping is also crucial for epidemiological purposes. Species of the *S. apiospermum* complex are worldwide-distributed filamentous fungi, but the origin of patients' contamination is still unknown. An environmental study performed in Austria and the Netherlands showed that *S. apiospermum* is the most frequent species in industrial areas, city parks and playgrounds and agricultural areas [35]. In contrast, *S. boydii* was found the major species in a French cohort of CF patients colonized by the *S. apiospermum* complex [19]. rep-PCR which allows both species identification and genotype analysis should facilitate the comparison of clinical and environmental isolates, and thus the identification of the origin of patients' contamination.

### Acknowledgment

This study was supported in part by a grant from the French non-profit patients' organization against cystic fibrosis, Vaincre la Mucoviscidose (#2010/IC1003).

### Conflict of interest

The authors declare no conflicts of interest. The study sponsor had no involvement in the study design, data analysis or decision to submit the manuscript for publication.

### References

- [1] George AM, Jones PM, Middleton PG. Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. *FEMS Microbiol Lett* 2009;300:153-164.
- [2] Cohen-Cyberknoh M, Shoseyov D, Kerem E. Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life. *Am J Respir Crit Care Med* 2011;183:1463-1471.
- [3] 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.
- [4] Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000;19:53-56.
- [5] Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feier IG, Marth E, Buzina W. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med Mycol* 2013; May 8. [Epub ahead of print].
- [6] Horré 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] Harun A, Gilgado F, Chen SC, Meyer W. 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* 2010;48 (Suppl. 1):S70-S76.
- [8] Vázquez-Tsuji O, Campos Rivera T, Rondán Zárate A, Mirabal García M. Endobronchitis by *Scedosporium apiospermum* in a child with cystic fibrosis. *Rev Iberoam Micol* 2006;23:245-248.
- [9] Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, *et al.* Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006;25:603-607.
- [10] 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;48:1978-1982.

- [11] Hirschi S, Letscher-Bru V, Pottecher J, *et al.* Disseminated *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Scedosporium apiospermum* coinfection after lung and liver transplantation in a cystic fibrosis patient. *J Clin Microbiol* 2012;50:4168-4170.
- [12] 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.
- [13] Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL. Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2007;51:748-751.
- [14] 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.
- [15] 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.
- [16] Gilgado F, Cano J, Gené 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.
- [17] Gilgado F, Gené J, Cano J, Guarro J. Heterothallism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleomorph *Pseudallescheria apiosperma* sp. nov. *Med Mycol* 2010;48:122-128.
- [18] Lackner M., de Hoog S.G., Yang L., *et al.* Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Diversity*, 25 July 2014.
- [19] Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S. Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* 2013;51:603-613.
- [20] 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.
- [21] Bernhardt A, Sedlacek L, Wagner S, Schwarz C, Würstl B, Tintelnot K. Multilocus sequence typing of *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2013;12:592-598.
- [22] Wise MG, Healy M, Reece K, *et al.* Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J Med Microbiol* 2007;56:778-787.
- [23] 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.
- [24] Healy M, Reece K, Walton D, *et al.* Use of the DiversiLab System for species and strain differentiation of *Fusarium* species isolates. *J Clin Microbiol* 2005;43:5278-5280.
- [25] Hammarskjöld F, Mernelius S, Andersson RE, *et al.* Possible transmission of *Candida albicans* on an intensive care unit: genotype and temporal cluster analyses. *J Hosp Infect* 2013;85:60-65.
- [26] Vandeputte P., Ghamrawi S., Rechenmann M., *et al.* Draft genome sequence of the pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. *Genome Announc* 2014 Oct 2;2(5). pii: e00988-14.
- [27] 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.
- [28] Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum *Candida albicans* presages FEV<sub>1</sub> decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest* 2010;138:1186-1195.
- [29] Fillaux J, Brémont F, Murriss M, *et al.* Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand J Infect Dis* 2012;44:842-847.
- [30] 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.
- [31] 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.
- [32] Del Chierico F, Masotti A, Onori M, *et al.* MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. *J Proteomics* 2012;75:3314-3330.
- [33] Sitterlé E, Giraud S, Leto J, *et al.* Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/Scedosporium* species. *Clin Microbiol Infect* 2014;20:929-935.
- [34] Steinmann J, Schmitt D, Buer J, Rath PM. Discrimination of *Scedosporium prolificans* against *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium apiospermum* by semiautomated repetitive sequence-based PCR. *Med Mycol* 2011;49:475-483.
- [35] Kaltseis J, Rainer J, de Hoog GS. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol* 2009;47:398-405.

### **Étude 2 : Mise en évidence de la colonisation chronique des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose par les espèces du complexe *Rasamsonia argillacea*.**

Les espèces du complexe *Rasamsonia argillacea* sont des pathogènes émergents, en particulier chez les patients atteints de mucoviscidose (Cystic Fibrosis). En 1999, *R. argillacea* a été rapporté pour la première fois dans ce contexte sous le nom de *Penicillium emersonii* (Cimon *et al.*, 1999). Seize autres cas ont ensuite été signalés en 2010 sous le nom de *Geosmithia argillacea* (Giraud *et al.*, 2010 ; Barton *et al.*, 2010), puis ce champignon a été reclassé dans le nouveau genre *Rasamsonia* (Houbraken *et al.*, 2012). Depuis leur première description chez l'homme (Cimon *et al.*, 1999), ces champignons ont été isolés régulièrement de l'animal (Grant *et al.*, 2009; Salgüero *et al.*, 2013; Kawalilak *et al.*, 2015) ou de l'homme (Barker *et al.*, 2014; Del Chierico *et al.*, 2012; Houbraken *et al.*, 2012; Jang *et al.*, 2012). Néanmoins, il est probable que le nombre d'infections causées par ces champignons soit sous-estimé en raison des erreurs d'identification avec des *Penicillium* ou des *Paecilomyces*.

Le genre *Rasamsonia* décrit en 2012 comportait alors six espèces, à savoir *R. argillacea*, *R. brevistipitata*, *R. byssochlamydoides*, *R. cylindrospora*, *R. eburnea* et *R. emersonii* (Houbraken *et al.*, 2012). Toutefois, l'année suivante, des travaux de phylogénie basés sur des analyses morphologiques, physiologiques et génétiques ont révélé que *R. argillacea* est un complexe de quatre espèces distinctes : *R. argillacea sensu stricto*, *Rasamsonia eburnea* et deux nouvelles espèces, *Rasamsonia piperina* et *Rasamsonia aegroticola* (Houbraken *et al.*, 2013).

Chez l'homme, les infections par les espèces du complexe *R. argillacea* ont été rapportées principalement dans un contexte de mucoviscidose (Giraud *et al.*, 2010; Barton *et al.*, 2010; Manso *et al.*, 2011; Terpstra *et al.*, 2011; Marguet *et al.*, 2012; Labbé *et al.*, 2013; Masoud-Landgraf *et al.*, 2014; Matos *et al.*, 2015), mais aussi de granulomatose septique familiale (CGD) (De Ravin *et al.*, 2011; Machouart *et al.*, 2011; Ishiwada *et al.*, 2015), de tuberculose (Sohn *et al.*, 2013), de greffe de moelle osseuse (Valentin *et al.*, 2012) ou après intervention chirurgicale avec pose d'une prothèse de l'aorte (Doyon *et al.*, 2013).

L'identification de ces champignons est importante du fait de leur pathogénicité qui a été rapportée dans divers contextes cliniques, y compris chez les patients atteints de CGD et les greffés de moelle osseuse qui ont développé une pneumonie et / ou des infections disséminées (Corzo-León *et al.*, 2015; Ishiwada *et al.*, 2015; Valentin *et al.*, 2012; De Ravin *et al.*, 2011; Machouart *et al.*, 2011) ou des patients atteints de tuberculose qui ont développé une balle fongique pulmonaire (Sohn *et al.*, 2013). Chez les patients atteints de mucoviscidose, aucune relation claire n'a été établie entre la colonisation des voies respiratoire par ces champignons et une détérioration clinique ou fonctionnelle. Toutefois, Marguet *et al.* (Marguet *et al.*, 2012) ont rapporté un cas d'infection respiratoire avérée dû à *R. argillacea* chez un patient CF. Des investigations plus poussées sont donc nécessaires pour déterminer les profils de colonisation des voies respiratoires des patients CF par ces

champignons et l'effet de cette colonisation sur la fonction respiratoire. Par ailleurs, ces espèces présentent des sensibilités différentes aux antifongiques ce qui renforce le besoin d'une identification précise des isolats pour une prise en charge thérapeutique adéquate. Cependant, l'absence de caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques propres aux différentes espèces du complexe *R. argillacea* rend difficile leur identification par les méthodes classiques. Le séquençage des régions ITS 1 et 2 de l'ADN ribosomique ou d'une partie du gène de la bêta-tubuline est donc nécessaire pour l'identification précise des espèces dans le complexe *R. argillacea* (Houbraken *et al.*, 2012; Houbraken *et al.*, 2013). Néanmoins, ces méthodes ne permettent pas la caractérisation infraspécifique à des fins épidémiologiques.

Dans ce contexte, nous nous sommes proposé d'évaluer l'intérêt de l'amplification des séquences répétitives de l'ADN rep-PCR pour la différenciation spécifique et infraspécifique des espèces du complexe *R. argillacea*. L'étude a été réalisée sur un panel de 116 isolats provenant de 26 patients atteints de mucoviscidose et d'un patient atteint de CGD. 24 des patients CF étaient suivis dans 6 hôpitaux en France (Angers, Brest, Giens, Le Havre, Paris et Rouen), un patient en Grèce et un au Royaume-Uni.

Parmi les souches étudiées, 16 avaient été précédemment identifiées par séquençage des régions ITS 1 et 2 et d'une partie des gènes codantes pour la tubuline et la calmoduline (Giraud *et al.*, 2010; Houbraken *et al.*, 2013). Pour les souches restantes, l'ADN génomique a été extrait à l'aide du kit DNeasy® Plant Mini Kit (Qiagen, Courtabeuf, France). L'identification a été réalisée après amplification d'une partie du gène de la  $\beta$ -tubuline et les produits d'amplification ont été purifiés à l'aide du kit NucleoSpin extract II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France), puis séquencés dans les deux sens. Les séquences nucléotidiques obtenues ont été comparées à celles déposées dans GenBank à l'aide de l'algorithme BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool nucleotide).

L'analyse rep-PCR a été réalisée après extraction de l'ADN génomique à partir du mycélium en utilisant le kit d'extraction MO-BIO Ultraclean preparation kit (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France). L'amplification par PCR des séquences répétitives de l'ADN avec le kit DiversiLab® *Fungal* kit (bioMérieux) a été réalisée comme précédemment décrit (Wise *et al.*, 2007). Les produits d'amplification ont été séparés par électrophorèse capillaire sur un bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, Les Ulis, France). Les profils électrophorétiques ont été comparés avec le logiciel DiversiLab® version 3.4 et les dendrogrammes ont été réalisés par la méthode UPGMA (Unweighed Pair Group Method with Arithmetic mean).

Sur les 116 isolats étudiés, 112 provenaient de patients atteints de mucoviscidose, *R. aegroticola* était l'espèce dominante avec 80 isolats, suivie de *R. argillacea sensu stricto* avec 27 isolats et *R. piperina* avec seulement 5 isolats. Aucun isolat n'a été identifié comme *R. eburnea*. Les quatre isolats provenant d'un patient atteint de CGD ont été identifiés comme *R. argillacea sensu stricto*. A l'exception d'un seul patient qui présentait deux espèces distinctes (*R. argillacea* en 2006 et *R. aegroticola* en 2009), tous les patients étaient colonisés / infectés par une seule espèce bien que plusieurs isolats (jusqu'à 18) aient été étudiés pour certains patients.

L'analyse des résultats obtenus avec la technique rep-PCR ont montré des regroupements cohérents avec les résultats de l'identification moléculaire des isolats. Dans le dendrogramme, trois clusters étaient clairement distincts, un premier cluster avec les 80 isolats identifiés comme *R. aegroticola*, un second avec les 31 isolats de *R. argillacea* et le troisième avec les 5 isolats de *R. piperina*.

La technique de génotypage rep-PCR a permis aussi la caractérisation infraspécifique au sein du complexe *R. argillacea*. 15 génotypes ont été identifiés parmi les 80 isolats de *R. aegroticola*, 9 génotypes pour *R. argillacea* et 5 génotypes pour *R. piperina* puisque les 5 isolats étudiés présentaient tous un génotype distinct. D'autre part, 7 génotypes étaient partagés entre plusieurs patients, tandis que 22 autres génotypes étaient spécifiques à un patient. En outre, aucun regroupement géographique n'a été observé ni au niveau de l'espèce ni au niveau du génotype.

D'autre part, l'analyse a montré que les isolats multiples (provenant d'un même prélèvement) présentaient pour la plupart un même profil électrophorétique, de même que les isolats séquentiels (issus de prélèvements successifs chez un même patient), révélant ainsi la capacité des espèces *R. aegroticola* et *R. argillacea sensu stricto* à coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients CF. Le même génotype était détecté chez certains patients sur une période de 5 à 11 ans.

En outre, sept génotypes ont été détectés sur des lieux différents : par exemple un même génotype a été identifié chez des patients suivis dans les hôpitaux de Giens et de Rouen, alors qu'un autre génotype était retrouvé au Royaume-Uni et en Grèce.

L'identification de certains génotypes capables de coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose suggère l'implication de ces espèces dans la réaction inflammatoire et la détérioration progressive de la fonction respiratoire comme il a été déjà démontré pour d'autres champignons, comme *Aspergillus fumigatus* (Amin *et al.*, 2010; Fillaux *et al.*, 2012) et *Candida albicans* (Chotirmall *et al.*, 2010).

Le présent travail confirme l'utilité de la technique rep-PCR pour l'identification des espèces et la différenciation des souches au sein du complexe *R. argillacea*. Cette première étude sur l'épidémiologie moléculaire de la colonisation des voies respiratoires par les espèces du complexe *R. argillacea* confirme la capacité de ces champignons à engendrer une colonisation chronique au cours de la mucoviscidose.



Article original 2

### Long-Term *Rasamsonia argillacea* Complex Species Colonization Revealed by PCR Amplification of Repetitive DNA Sequences in Cystic Fibrosis Patients

Published in *Journal of Clinical Microbiology*, November 2016 Volume 54 Number 11

(doi:10.1128/JCM.01462-16)

Received 8 July 2016; Revised 28 July 2016; Accepted 1 September 2016

Abdelmounaim Mouhajir<sup>a,b</sup>, Olivier Matray<sup>c,d</sup>, Sandrine Giraud<sup>a</sup>, Laurent Mély<sup>e</sup>, Christophe Marguet<sup>f</sup>, Isabelle Sermet-Gaudelus<sup>g</sup>, Solène Le Gal<sup>a,h</sup>, Franck Labbé<sup>i</sup>, Christine Person<sup>j</sup>, Françoise Troussier<sup>k</sup>, Jean-Jacques Ballet<sup>c</sup>, Gilles Gargala<sup>c,d</sup>, Rachid Zouhair<sup>b</sup>, Marie-Elisabeth Bougnoux<sup>l</sup>, Jean-Philippe Bouchara<sup>a,m</sup>, Loïc Favennec<sup>d</sup>

L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, Angers, France<sup>a</sup>; University Moulay Ismail, Faculty of Sciences, Meknes, Morocco<sup>b</sup>; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Rouen, France<sup>c</sup>; Normandie University, UNIROUEN, Rouen, France<sup>d</sup>; Centre de Ressources et de Compétences en Mucoviscidose, Hôpital Renée Sabran, Giens, France<sup>e</sup>; Centre de Ressources et de Compétences en Mucoviscidose, Service de Pédiatrie, Hôpital Charles Nicolle, Rouen, France<sup>f</sup>; Centre de Ressources et de Compétences en Mucoviscidose, Unité de Pédiatrie, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France<sup>g</sup>; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Brest, France<sup>h</sup>; Laboratoire de Microbiologie, Hôpital Jacques Monod, Le Havre, France<sup>i</sup>; Centre de Ressources et de Compétences en Mucoviscidose Adultes, Service de Pneumologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France<sup>j</sup>; Centre de Ressources et de Compétences en Mucoviscidose Enfants, Service de Pédiatrie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France<sup>k</sup>; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire Necker-Enfants Malades, Paris, France<sup>l</sup>; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France<sup>m</sup>

A.M. and O.M. contributed equally to this work, as did J.-P.B. and L.F.

Address correspondence to Loïc Favennec, loic.favennec@chu-rouen.fr.

**The aim of this work was to document molecular epidemiology of *Rasamsonia argillacea* species complex isolates from cystic fibrosis (CF) patients. In this work, 116 isolates belonging to this species complex and collected from 26 CF patients and one patient with chronic granulomatous disease were characterized using PCR 7 amplification assays of repetitive DNA sequences and electrophoretic separation of amplicons (rep-PCR). Data revealed a clustering consistent with molecular species identification. A single species was recovered from most patients. *Rasamsonia aegroticola* was the most common species, followed by *R. argillacea sensu stricto* and *R. piperina*, while *R. eburnea* was not identified. Of 29 genotypes, 7 were shared by distinct patients while 22 were patient specific. In each clinical sample, most isolates exhibited an identical genotype. Genotyping of isolates recovered from sequential samples from the same patient confirmed the capability of *R. aegroticola* and *R. argillacea* isolates to chronically colonize the airways. A unique genotype was recovered from two siblings during a 6-month period. In the other cases, a largely dominant genotype was detected. Present results which support the use of rep-PCR for both identification and genotyping for the *R. argillacea* species complex provide the first molecular evidence of chronic airway colonization by these fungi in CF patients**

**Key-words:** *Rasamsonia argillacea* species complex; cystic fibrosis; rep-PCR; genotyping.

### INTRODUCTION

*Rasamsonia argillacea* which was first reported in clinical practice as a *Penicillium*, then reclassified in the genus *Geosmithia*, and finally reassigned in 2013 to the new genus *Rasamsonia*, is now considered an emerging pathogen (1). Since its first report in human as *Penicillium emersonii* (2), there has been an increasing number of case reports in both dogs (3, 4, 5) and humans (6). Nevertheless, it is likely that the number of human infections caused by this fungus has long been underestimated because of the lack of specificity of its morphological features and to subsequent misidentifications with some *Penicillium* or *Paecilomyces* species.

Only six species were previously recognized in the genus *Rasamsonia* described in 2012, i.e. *R. argillacea*, *R. composticola*, *R. brevistipitata*, *R. byssochlamydoides*, *R. cylindrospora* and *R. emersonii* (7). However, multilocus sequence analysis of several *R. argillacea* isolates revealed a clustering which superimposed with some phenotypic differences. Therefore, *R. argillacea* is now considered a species complex comprising four distinct species: *R. argillacea sensu stricto*, *R. piperina*, *R. aegroticola* and *R. eburnea* (8).

Infections caused by species of the *R. argillacea* complex have been reported in various clinical contexts in human. Chronic granulomatous disease (CGD) (9, 10, 11) and cystic fibrosis (CF) (12, 13, 14, 15, 16, 17) are the major underlying clinical conditions. *Rasamsonia* infections may also occur in bone marrow transplant recipients (18, 19), but also in the absence of any predisposing factors as evidenced by the pulmonary and aortic graft infection reported by Doyon *et al.* (20) in an immunocompetent individual.

The importance of the identification of these fungi is underlined by their pathogenicity which was documented in various clinical settings, including CGD patients and bone marrow transplant recipients who developed pneumonia and/or disseminated infections (9, 10, 11, 18, 19) or patients with tuberculosis who suffered from fungal balls in the lung (21). In CF patients, all species of the *R. argillacea* complex except *R. eburnea* have been reported to colonize the airways (8). While no clear relationship was established in the CF context between the colonization of the airways by these fungi and a clinical or functional deterioration, the recent report of *R. argillacea* pathogenicity in one patient with CF prompts further investigation (14). In addition, differences between these closely related species in their antifungal susceptibility profiles further emphasizes the need for an accurate identification of the fungus for optimal therapy (1, 8). However, members of the genus *Rasamsonia*, particularly those belonging to the *R. argillacea* species complex are difficult to identify precisely in a routine clinical setting because of the lack of specific traits in their macroscopic and microscopic morphology. Sequencing of the internal transcribed spacer (ITS) 1 and 2 regions of ribosomal DNA, or of part of the beta-tubulin gene therefore is required for accurate species identification within the *R. argillacea* complex (7, 8). Nevertheless, these methods are time-consuming and do not allow strain differentiation for epidemiological purposes. In this context, this work was designed to evaluate the interest of PCR amplification of repetitive DNA sequences (rep-PCR) for species and strain delineation

within this species complex. Study was conducted using a large panel of multiple (originating from the same clinical sample) or sequential (originating from successive samples from the same patient) isolates from CF patients and from one acutely infected CGD patient. Results from ITS regions or beta-tubulin gene sequencing were compared to those obtained using the semi-automated Diversilab system (bioMérieux) based on PCR amplification of repetitive sequences followed by microelectrophoretic separation of the amplicons and size analysis using a dedicated software.

## MATERIALS AND METHODS

### *Clinical isolates and culture conditions*

One hundred and nine isolates collected from 1996 to December 2012 from sputum samples from 24 patients with CF followed-up in six geographically distant hospitals in France were included in this study. Three isolates recovered from two CF patients followed-up in the United Kingdom (1 isolate) and in Greece (2 isolates), as well as four isolates recovered from one French patient with CGD, were studied in parallel.

Isolates were kept frozen at - 20°C until used. After thawing, they were plated on yeast extract-peptone-dextrose (YPD) agar plates supplemented with chloramphenicol (0.5 g/L). After incubation at 37°C for 7 days, the aerial mycelium was scraped from the agar surface and then inoculated in YPD broth which was incubated for 10 days at 37°C without stirring. Mycelium was finally harvested and ground in liquid nitrogen.

### *Species identification*

Apart from 16 of the isolates studied which had been previously identified by ITS 1 and 2 regions, beta-tubulin and calmodulin gene sequencing (8, 13), species identification was performed by PCR amplification of part of the beta-tubulin gene (TUB locus). After grinding the mycelium in liquid nitrogen, DNA was extracted using the DNA easy Plant Mini Kit (Qiagen, Courtabeuf, France), and the TUB locus was amplified as previously described (22). The amplified products were then purified using the NucleoSpin extract II kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) and sequenced in both directions. The obtained sequences were analyzed by individual BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool) searches using the NCBI (National Center for Biotechnology Information) BLAST database. Ninety-seven to 100% sequence similarity to isolates previously analyzed by Houbraken *et al.* (8) was used for precise species identification within the *R. argillacea* complex.

### *Semiautomated repetitive sequence-based PCR and data analysis*

Fungal DNA was extracted from mycelial homogenates using the MO-BIO Ultraclean preparation kit (Ozyme, Saint-Quentin en Yvelines, France) according to the manufacturer's recommendations except for the protein precipitation step, the duration of which was extended overnight at 4°C. DNA was quantified using a Nanodrop spectrometer (Thermofisher Scientific, Illkirsch, France) for a target value  $\geq 25$  ng/mL. PCR amplification of repetitive DNA sequences was realized using the DiversiLab Fungal kit (bioMérieux) as

described previously (23). Amplicons were separated by capillary electrophoresis on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Massy, France). Single electrophoretic profiles obtained for each isolate were compared using the DiversiLab Healthcare software (version 3.41). The phylogenetic analysis was based on dendrograms generated by the Diversilab software using the unweighted pair group method with arithmetic means (UPGMA). Isolates sharing less than 95% similarity were considered as belonging to distinct rep-PCR genotypes which were numbered according to their order in the dendrogram.

### *Accession number(s)*

The sequences described were submitted to GenBank under the accession numbers given in Table 1.

## RESULTS

### *Species identification*

In addition to the 16 isolates already identified at the species level by Houbraken *et al.* (8) or Giraud *et al.* (13), 96 isolates also recovered from sputum samples from CF patients were analyzed by TUB sequencing (Table 1). Among all these isolates, *R. aegroticola* was by far the most common species, representing 80 isolates, followed by *R. argillacea stricto sensu* and *R. piperina* which accounted for 27 and 5 isolates, respectively. *Rasamsonia eburnea* never was identified. Only one patient (P22) carried successively two distinct species (*i.e.* *R. argillacea* in 2006 and *R. aegroticola* in 2009), although up to 18 isolates were studied for other patients. The four isolates from patient P27 with CGD were also identified as *R. argillacea sensu stricto*.

rep-PCR was conducted on the whole set of isolates using the mold DNA fingerprinting primer kit, and from the obtained electrophoretic profiles, the isolates were categorized as indistinguishable, closely related, or different according to the interpretative criteria provided by the manufacturer. An example of isolates sharing the same electrophoretic profile and therefore belonging to the same rep-PCR genotype is presented in Fig. 1A with *R. aegroticola* AU49708718 and AU49709968 isolates obtained from two successive sputum samples from patient P17. Figure 1B shows an example of closely related isolates, *i.e.*, differing only by 1 or 2 peaks, with *R. argillacea sensu stricto* AU 080618744-01/3 and AU 125955913-01/3 isolates collected from distinct sputum samples from patient P24. An example of genetically different isolates with electrophoretic profiles differing by at least 3 peaks is shown in Fig. 1C, with *R. piperina* AU 110334223-01 and AU 080120123-01 isolates recovered from two patients (P19 and P20) followed up in geographically distant hospitals.

**Table 1** Species and genotype of studied clinical *Rasamsonia* isolates<sup>d</sup>

Patient number	Sampling date	Isolate number	Geographic origin	rep-PCR genotype	Species identification <sup>d</sup>	Genbank accession number <sup>a</sup>
P1	2008-02-15	080120121-01	Giens	13	<i>R. aegroticola</i>	KT873369
	2008-10-02	080578563-01		16	<i>R. aegroticola</i>	GU165734 <sup>b</sup>
	2009-08-03	090482165-01		13	<i>R. aegroticola</i>	KT873370
	2009-09-22	090602132-01		13	<i>R. aegroticola</i>	KT873365
	2010-10-04	100640715-01/2		13	<i>R. aegroticola</i>	KT873363
P2	2011-04-13	110201721-01	Rouen	16	<i>R. aegroticola</i>	KT873374
P3	2011-02-07	110089119-01	Angers	16	<i>R. aegroticola</i>	KT873379
	2011-11-21	115371503-51		16	<i>R. aegroticola</i>	KT873346
P4	2011-06-22	110349466-02	Paris	15	<i>R. aegroticola</i>	KT873351
	2011-10-26	1110M260319		15	<i>R. aegroticola</i>	KT873350
	2012-01-18	1201M180296		15	<i>R. aegroticola</i>	KT873348
P5	2011-10-26	1110M262314	Paris	15	<i>R. aegroticola</i>	KT873352
	2012-01-18	1201M180402		15	<i>R. aegroticola</i>	KT873347
		1201M180404		15	<i>R. aegroticola</i>	KT873355
	2012-03-15	1203M150283		15	<i>R. aegroticola</i>	KT873354
	2012-03-22	1203M220242		15	<i>R. aegroticola</i>	KT873356
1203M220245		15	<i>R. aegroticola</i>	KT873353		

Table 1 (continued): Species and genotype of studied clinical *Rasamsonia* isolates.

Patient number	Sampling date	Isolate number	Geographic origin	rep-PCR genotype	Species identification	Genbank accession number <sup>a</sup>
P6	2009-11-25	090694857-01	Angers	15	<i>R. aegroticola</i>	KT873360
	2010-02-17	100112439-01		15	<i>R. aegroticola</i>	KT873358
P7	2009-11-03	090676598-01	Giens	15	<i>R. aegroticola</i>	KT873357
	2010-01-05	100037113-01		15	<i>R. aegroticola</i>	KT873359
	2010-10-07	100663651-01		16	<i>R. aegroticola</i>	KT873349
P8	2010-07-07	100421474-01	Angers	15	<i>R. aegroticola</i>	KT873371
P9	2010-06-22	100563919-02	Rouen	17	<i>R. aegroticola</i>	KT873384
	2010-12-16	110098614-01		16	<i>R. aegroticola</i>	KT873372
	2011-01-07	120138251-01		17	<i>R. aegroticola</i>	KT873385
	2011-03-08	110201710-01		16	<i>R. aegroticola</i>	KT873373
	2011-03-30	110201720-01		16	<i>R. aegroticola</i>	KT873375
	2011-05-13	120138254-01		15	<i>R. aegroticola</i>	KT873382
	2011-06-14	110245715-01		16	<i>R. aegroticola</i>	KT873381
	2011-08-09	110310506-01		16	<i>R. aegroticola</i>	KT873380
	2011-09-09	110310508-01		13	<i>R. aegroticola</i>	KT873378
	2011-12-02	110358956-01		15	<i>R. aegroticola</i>	KT873376
2012-08-29	120167555-01	16	<i>R. aegroticola</i>	KT873377		

Table 1 (continued): Species and genotype of studied clinical *Rasamsonia* isolates.

Patient number	Sampling date	Isolate number	Geographic origin	rep-PCR genotype	Species identification	Genbank accession number <sup>a</sup>
P10	2011-05-05	110235102-01	Rouen	10	<i>R. aegroticola</i>	KT873388
	2011-08-25	11081139		12	<i>R. aegroticola</i>	KT873389
	2011-11-14	110349459-01		18	<i>R. aegroticola</i>	KT873390
	2012-03-14	120097976-01		10	<i>R. aegroticola</i>	KT873391
	2012-04-19	120138238-01		10	<i>R. aegroticola</i>	KT873392
	2012-06-21	12060929		10	<i>R. aegroticola</i>	KT873393
P11	2003	IHEM 20178	Brest	11	<i>R. aegroticola</i>	KT873394
P12	2011-08-03	UOA/HCPF 13695	Athens	19	<i>R. aegroticola</i>	KT873387
	2012-07-18	UOA/HCPF 14683a		19	<i>R. aegroticola</i>	KT873386
P13	1991	NCPF 2801	UK	19	<i>R. aegroticola</i>	JX272998 <sup>c</sup>
P14	2005-08-31	40505666/1	Giens	20	<i>R. aegroticola</i>	GU165728 <sup>b</sup>
		40505666/2		20	<i>R. aegroticola</i>	KT873361
		40505666/3		19	<i>R. aegroticola</i>	KT873364
		40505666/4		20	<i>R. aegroticola</i>	KT873368
		40505666/5		23	<i>R. aegroticola</i>	KT873366
	2007-11-07	40709168	20	<i>R. aegroticola</i>	GU165729 <sup>b</sup>	

Table 1 (continued): Species and genotype of studied clinical *Rasamsonia* isolates.

Patient number	Sampling date	Isolate number	Geographic origin	rep-PCR genotype	Species identification	Genbank accession number <sup>a</sup>
P15	2007-04-20	070116422-01	Rouen	23	<i>R. aegroticola</i>	GU165736 <sup>b</sup>
	2007-06-25	070116430-01		21	<i>R. aegroticola</i>	GU165737 <sup>b</sup>
	2007-11-12	070116440-01		21	<i>R. aegroticola</i>	GU165738 <sup>b</sup>
	2008-10-01	080677948-01		21	<i>R. aegroticola</i>	GU165739 <sup>b</sup>
	2008-12-08	100608593-01		23	<i>R. aegroticola</i>	KT873399
	2009-03-16	090213107-01		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873411
	2009-06-10	100608601-01		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873400
	2009-08-27	100608602-01		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873410
	2009-10-07	120137893-01		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873408
	2009-10-15	100608604-01		23	<i>R. aegroticola</i>	KT873415
	2009-11-26	11031051		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873416
	2010-01-04	100608605-01		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873409
	2010-04-14	100608607-01		19	<i>R. aegroticola</i>	KT873402
	2010-05-17	100608609-01		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873404
2010-12-13	110098612-01	21	<i>R. aegroticola</i>	KT873396		



Table 1 (continued): Species and genotype of studied clinical *Rasamsonia* isolates.

Patient number	Sampling date	Isolate number	Geographic origin	rep-PCR genotype	Species identification	Genbank accession number <sup>a</sup>
P16	2011-06-22	110251637-01	Le Havre	22	<i>R. aegroticola</i>	KT873367
P17	1996	49701666	Giens	21	<i>R. aegroticola</i>	KT873414
	1997-09-25	49707800		19	<i>R. aegroticola</i>	DQ317583/ DQ317584 <sup>b</sup>
	1997-10-27	49708718		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873405
	1997-12-11	49709968		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873398
	1998-01-21	49800813/1		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873403
		49800813/2		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873406
		49800813/3		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873395
		49800813/4		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873401
		49800813/5		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873413
		49800813/6		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873412
49800813/7		21	<i>R. aegroticola</i>	KT873407		
2001	IHEM 18732	21	<i>R. aegroticola</i>	KT873397		
P18	2011-01-18	120138249-01	Rouen	24	<i>R. aegroticola</i>	KT873383
P19	2011-10-12	110334223-01	Rouen	27	<i>R. piperina</i>	KT873447

Table 1 (continued): Species and genotype of studied clinical *Rasamsonia* isolates.

Patient number	Sampling date	Isolate number	Geographic origin	rep-PCR genotype	Species identification	Genbank accession number <sup>a</sup>
P20	2007-10-09	40708324	Giens	26	<i>R. piperina</i>	GU165731 <sup>b</sup>
	2008-01-07	080033462-01		25	<i>R. piperina</i>	KT873444
	2008-02-20	080120123-01		29	<i>R. piperina</i>	GU165733 <sup>b</sup>
P21	2010-11-05	120140359-01	Rouen	28	<i>R. piperina</i>	KT873445
P22	2006-12-14	40608890	Angers	3	<i>R. argillacea</i>	GU165726 <sup>b</sup>
	2009-11-03	090654817-01		14	<i>R. aegroticola</i>	KT873362
P23	2011-10-26	1110M260218	Paris	5	<i>R. argillacea</i>	KT873428
	2012-03-14	1203M140384		5	<i>R. argillacea</i>	KT873427
P24	2007-09-18	40707439	Angers	2	<i>R. argillacea</i>	GU165722 <sup>b</sup>
	2007-11-29	070069943-01		9	<i>R. argillacea</i>	KT873424
	2007-12-05	070078695-01		4	<i>R. argillacea</i>	KT873426
	2008-02-26	080118059-01/1		4	<i>R. argillacea</i>	GU165724 <sup>b</sup>
		080118059-01/2		1	<i>R. argillacea</i>	KT873431
		080118059-01/3		4	<i>R. argillacea</i>	KT873422
	2008-04-15	080220281-01/1		4	<i>R. argillacea</i>	KT873435
	2008-09-22	080536592-01		4	<i>R. argillacea</i>	GU165725 <sup>b</sup>

Table 1 (continued): Species and genotype of studied clinical *Rasamsonia* isolates.

Patient number	Sampling date	Isolate number	Geographic origin	rep-PCR genotype	Species identification	Genbank accession number <sup>a</sup>
P24 (continued)	2008-11-03	080618744-01/1	Angers	1	<i>R. argillacea</i>	KT873430
		080618744-01/3		1	<i>R. argillacea</i>	KT873436
		080618744-01/4		9	<i>R. argillacea</i>	KT873443
		080618744-01/5		1	<i>R. argillacea</i>	KT873425
	2009-06-15	090361642-01		1	<i>R. argillacea</i>	KT873432
	2010-02-23	100122619-01		1	<i>R. argillacea</i>	KT873434
	2012-12-18	125955913-01/1		1	<i>R. argillacea</i>	KT873439
		125955913-01/2		1	<i>R. argillacea</i>	KT873440
		125955913-01/3		1	<i>R. argillacea</i>	KT873441
		125955913-01/4		1	<i>R. argillacea</i>	KT873442
P25	2009-02-01	090143735-01	Rouen	8	<i>R. argillacea</i>	JX273009 <sup>c</sup>
P26	2011-09-02	110310498-01	Rouen	3	<i>R. argillacea</i>	KT873429
	2011-12-22	11121060		6	<i>R. argillacea</i>	KT873438
	2012-01-03	120030197-01		3	<i>R. argillacea</i>	KT873421
	2012-02-10	120138261-01		3	<i>R. argillacea</i>	KT873437
	2012-08-17	120143501-01		3	<i>R. argillacea</i>	KT873423

Table 1 (continued): Species and genotype of studied clinical *Rasamsonia* isolates.

Patient number	Sampling date	Isolate number	Geographic origin	rep-PCR genotype	Species identification	Genbank accession number <sup>a</sup>
P27	2010-03-22	1003M220610	Paris	7	<i>R. argillacea</i>	KT873419
	2010-03-24	1003M240080		7	<i>R. argillacea</i>	KT873418
	2010-03-25	1003M250191		7	<i>R. argillacea</i>	KT873417
		1003M250160		7	<i>R. argillacea</i>	KT873420

<sup>a</sup>All isolates were identified at the species level in the present study unless otherwise indicated. GenBank accession numbers correspond to the nucleotide sequence of ITS 1 and 2 regions of rRNA genes for isolates identified by Giraud *et al.* (13) or of part of the beta-tubulin gene (TUB locus) for the other isolates.

<sup>b</sup>Sequences previously identified by Giraud *et al.* (13).

<sup>c</sup>Sequences previously identified by Houbraken *et al.* (8).

<sup>d</sup>All isolates were recovered from sputum samples from patients with cystic fibrosis, except isolates from patient P27, who suffered from chronic granulomatous disease.

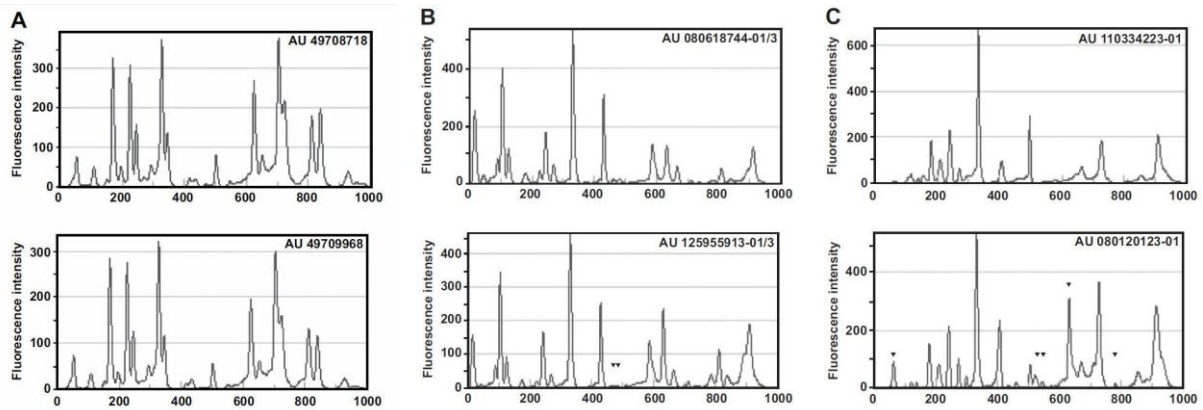


FIG 1 Typical examples of electrophoretic profiles obtained by rep-PCR using the mold DNA fingerprinting primer kit. (A) Identical profiles with *R. aegroticola* AU 49708718 and AU 49709968 isolates obtained from two successive sputum samples from patient P17. (B) Related profiles, *i.e.*, differing by only 1 or 2 peaks, with *R. argillacea sensu stricto* AU 080618744-01/3 and AU 125955913-01/3 isolates collected from distinct sputum samples from patient P24. (C) Distinct profiles differing by at least 3 peaks with *R. piperina* AU 110334223-01 and AU 080120123-01 isolates recovered from two distinct patients, P19 and P20.

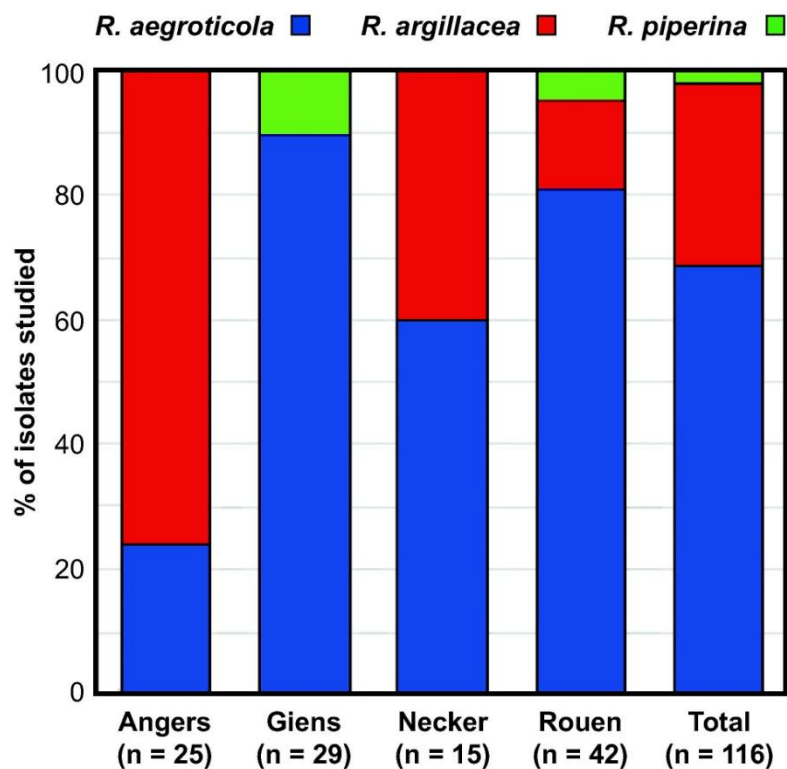


FIG 2 Species distribution within the *R. argillacea* species complex according to the geographic origin of studied isolates. Two isolates were available for one of the patients followed up in Angers Hospital, and their analysis revealed distinct species.

By rep-PCR, the isolates were grouped into three clusters strictly superimposed with species identification by ITS 1 and 2 regions or beta-tubulin gene sequencing (Table 1). Figure S1 shows the dendrogram constructed by the Diversilab software from the electrophoretic profiles of the amplicons generated by rep-PCR analysis of the different isolates. All the 80 isolates identified by TUB sequencing as *R. aegroticola* were grouped in the same cluster, clearly separated from the 31 *R. argillacea sensu stricto* which constitute another cluster and from the 5 *R. piperina* isolates which were grouped in a third cluster.

In addition, no clustering was seen by rep-PCR according to the geographic origin of the patients. Although *R. piperina*, the less common species, was detected only from patients followed-up in Giens and Rouen hospitals, *R. argillacea* and *R. aegroticola* were equally recovered from the different locations (Figure 2). For example, *R. aegroticola* was identified from 4/6, 4/5, 2/4 and 6/10 patients from Angers, Giens, Paris-Necker and Rouen hospitals.

### *Genotype differentiation and patterns of colonization*

rep-PCR also permitted strain delineation within the *R. argillacea* species complex. Fifteen genotypes were identified among the 80 *R. aegroticola* isolates. Nine genotypes were identified for *R. argillacea sensu stricto*, and all five *R. piperina* isolates were identified as distinct genotypes.

The 80 isolates identified as *R. aegroticola* were recovered from 68 sputum samples collected from 19 CF patients (Table 1). Only one sputum sample was available for six of the patients, but at least two culture-positive samples were collected for the others. Only one sputum sample was available for six of the patients, but at least two culture-positive samples were collected for the others. Apart from patient P22, who successively carried two distinct species, rep-PCR analysis showed that 5 of the patients were colonized by a single genotype conserved over time, while a dominant genotype was identified in successive samples from the seven remaining patients, associated with one to three other genotypes of the same species found occasionally (Fig. 3). Interestingly *R. aegroticola* was identified from two siblings followed-up in Paris-Necker hospital (P4 and P5) and all the respective isolates (3 and 6 corresponding to 3 and 4 sputum samples) belonged to the same genotype.

Twenty-seven isolates from 5 CF patients and 4 isolates from patient P27 with CGD were identified as *R. argillacea sensu stricto*. One CF patient (P25) was sampled only once. In contrast, two sputum samples were available for another CF patient (P23), and rep-PCR analysis of the corresponding isolates revealed the same genotype in the two samples. For patient P26, five isolates from successive sputum samples were analyzed and four of them belonged to the same genotype. Another example of genotype variation over time is provided by patient P24 (Fig. 3).

For this patient, 18 isolates corresponding to 10 sputum samples were analyzed. Distinct genotypes were identified from the first culture-positive samples, but only the last one (genotype 4) was really developing in the respiratory tract, causing a chronic colonization of the airways attested by the regular detection of this genotype during a 9-month period. Then another genotype was detected (genotype 1), which progressively became dominant (10 out of the 18 isolates), leading finally to the eradication of genotype 4. One genotype (genotype 3) was shared by two out of the five CF patients who were followed-up in geographically distant hospitals. Genotype 7 which was identified in the three samples from patient P27 with CGD, was not detected from CF patients.

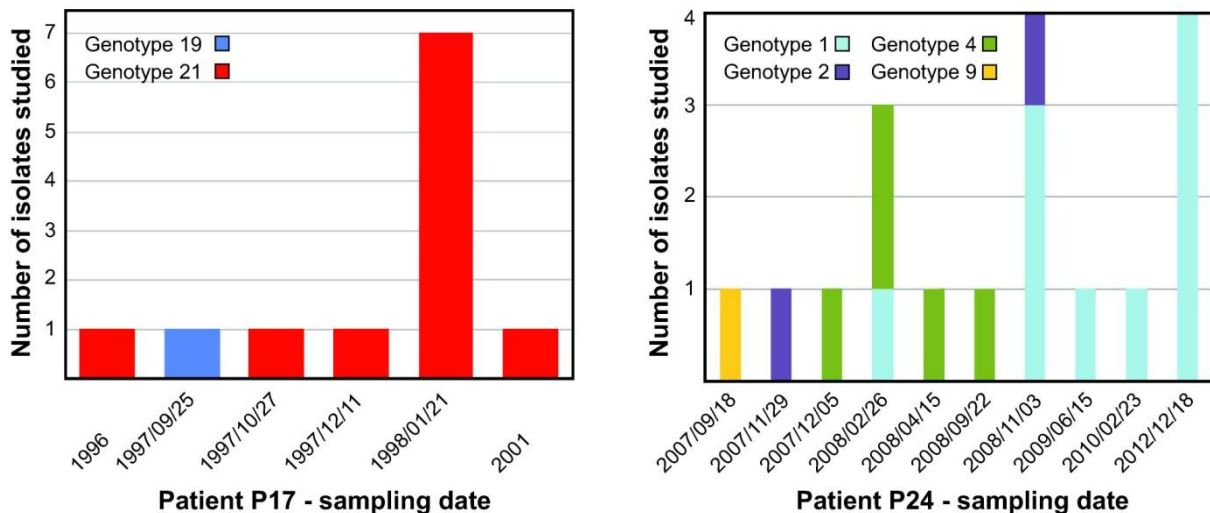


FIG 3 Colonization pattern of two sequentially sampled CF patients showing a largely dominant genotype associated with one genotype found only once (patient P17) or two distinct genotypes successively causing a chronic colonization (patient P24). Genotypes are represented by distinct colors.

*Rasamsonia piperina* was identified from three patients (Table 1). A total number of five isolates were typed by rep-PCR and they all belonged to different genotypes. A unique isolate was available for two of the patients, while three isolates from successive culture-positive samples were analyzed for the third patient (P20). Rep-PCR analysis of these successive isolates revealed three different genotypes, suggesting a repeated but transient carriage of always distinct genotypes unable to establish within the respiratory tract.

Genotypes restricted to a single patient were found in 7/19, 5/6, and 3/3 patients colonized by *R. aegroticola*, *R. argillacea sensu stricto*, and *R. piperina*, respectively. Two of the species identified in this study, i.e. *R. aegroticola* and *R. argillacea*, were found to be capable of chronically colonizing the lower airways of CF patients, with the same genotype being detected for some patients over a 5- to 11-year period. Six of the genotypes identified for *R. aegroticola* were shared by distinct patients (particularly genotypes 15 and 16, which were detected from 6 and 5 patients, respectively), while all but one *R. argillacea* genotype were patient specific.

In addition, seven genotypes were detected from different locations, for example, the same genotype (genotype 19) was identified from patients followed up in Giens and Rouen hospitals and also in the United Kingdom and Greece.

### Discussion

Since its first description in humans as *Penicillium emersonii* (2), then as *Geosmithia argillacea* (12, 13), and finally as *R. argillacea* (1), the number of case reports involving the *R. argillacea* species complex is dramatically increasing in patients with CF or CGD. Accordingly, 24 out of the 27 patients included in the present study were diagnosed since 2005 and 15 of them since 2010. Nevertheless, nothing is known about the epidemiology of the colonization of the airways by these fungi. In addition, precise species identification within this complex remains difficult: these fungi are not included in the databases used for matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (24); therefore, precise identification of these species still requires the sequencing of discriminant regions in the fungal genome.

In the present study, a large set of clinical *R. argillacea* (*sensu lato*) isolates was investigated using the semiautomated DiversiLab system based on the analysis of repetitive DNA sequences. rep-PCR has been previously used successfully for species and/or strain differentiation in several fungal groups, including *Candida* and *Aspergillus* species, as well as dermatophytes and some dimorphic fungi (25, 26, 27, 28, 29). Recently, Matray *et al.* (23) showed that this method also allows species identification within the *Scedosporium apiospermum* species complex, another group of sibling species encountered in patients with CF, as well as in CGD patients. rep-PCR analysis of our set of isolates revealed a clustering consistent with data from ITS or beta-tubulin sequencing, thereby demonstrating that this method is also suitable for species identification within the *R. argillacea* complex.

As previously reported, only three species of the complex were identified from respiratory secretions of CF patients, *i.e.*, *R. aegroticola*, *R. argillacea*, and *R. piperina*, but not *R. eburnea*. As previously reported (8), very few samples revealed *R. piperina*. However, in contrast to data from Houbraken *et al.* (8), *R. aegroticola* was largely more common than *R. argillacea sensu stricto* in the present group of CF patients. Isolates from one CGD patient were also analyzed, showing an infection caused by *R. argillacea sensu stricto*. Strikingly, in all cases of *Rasamsonia* infections previously reported in CGD patients since 2000 (9, 10, 11), all species of the *R. argillacea* complex were found except for *R. eburnea*, which is known today only from the environment. All of these species are very close genetically, and therefore it is likely that they share several similar features in their physiology and biology. Since the sequence of the whole genome of two *Rasamsonia* species (*R. emersonii* and *R. byssochlamydoides*) is now available, studies consisting of sequencing the genome of several strains of each species of this complex and of a comparative bioinformatic analysis of the obtained data should be conducted to search for genes common to the three pathogenic species but absent from *R. eburnea* and therefore potentially involved in pathogenicity. A similar approach is currently being used for species of the *S. apiospermum* complex, since



all but one species of this complex, *S. dehoogii*, have been described in the CF context (22), although *S. dehoogii* was shown to be one of the most abundant species in the environment (30, 31).

Present data provide the first description of an association of different *Rasamsonia* species in the respiratory tract of a CF patient and of sequential variations of *Rasamsonia* genotypes in the CF lung. Some genotypes of *R. argillacea* and *R. aegroticola* were found persisting for months or years in sequentially sampled CF patients, suggesting that these species chronically colonize the lower airways of CF patients. The capacity of *R. piperina* to chronically colonize the airways was not demonstrated here, but there were only a limited number of CF patients positive for this fungus and very few isolates available for each positive patient. In addition, the influence of prior antifungal therapies and/or of bacterial or other fungal pathogens previously colonizing the airways or causing a respiratory infection was not documented in the present study.

Pathogenicity of the *R. argillacea* complex in CGD patients was unambiguously established, since most patients suffered from pneumonia and/or invasive infection of adjacent tissues (9, 10, 11). In contrast, it seems more limited in CF, with a unique case of respiratory infections caused by this species complex having been reported for this genetically inherited disease (14). Nevertheless, the present identification of some genotypes chronically colonizing the lower airways of patients with CF demonstrates the persistence of these usually saprophytic fungi in the respiratory tract and their multiplication, suggesting their contribution to the inflammatory reaction which progressively leads to clinical and functional deterioration, as demonstrated for long-term colonization of the airways by *Aspergillus fumigatus* or *Candida albicans* (32, 33, 34).

Among the 116 isolates studied here, 29 genotypes were identified. Interestingly, while most genotypes were patient specific, some genotypes were shared by different patients. Six out of the 15 *R. aegroticola* genotypes were shared by epidemiologically unrelated patients living in different geographical areas. Three genotypes were detected from 5 or 6 patients, suggesting a higher capability to colonize the lower airways of the patients. Alternatively, one may also consider a wider distribution or a higher frequency of these genotypes in the environment. Nevertheless, although a few strains have been described from environmental sources, little information is available regarding the ecology of these fungi. Inhalation of some airborne spores has been suggested, but the sources of contamination of the patients remain to be defined.

In addition, two siblings followed up in the Paris-Necker hospital were found to be colonized by the same genotype, suggesting patient-to-patient transmission or contamination through a common source from their environment. Patient-to-patient transmission between siblings with CF or acquisition of the same strain from an identical environmental source within the family situation has been demonstrated for many bacterial pathogens, including methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia*, and *Achromobacter xylosoxidans* (35, 36, 37, 38). Likewise, concordance in the genotypes colonizing the respiratory tract of siblings suffering from CF has also been reported for some fungal pathogens, like *Candida* species (39) and *Pneumocystis jirovecii* (40). Investigations

should be conducted in order to clarify the ecology of these fungi and to identify potential niches in the indoor environment of the patients.

In conclusion, rep-PCR was revealed to be a useful tool for both species identification and strain delineation within the *Rasamsonia argillacea* complex. However, the number of genotypes detected using the present technique may be underestimated, and other typing systems, like multilocus sequence typing or microsatellite marker analysis, should be developed for *Rasamsonia* species in order to confirm our results. Nevertheless, the present study provides the first description of the molecular epidemiology of airway colonization by species of the *R. argillacea* complex in CF patients and demonstrates sequential genotype variations in long-term colonized patients.

### AKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Pr. Aristeia Velegraki (Mycology Research Laboratory, Microbiology Department, Medical School, National and Kapodistrian University of Athens, Athens, Greece) and Dr. Michael Arabatzis (First Department of Dermatology, Medical School, Aristotle University of Thessaloniki, Thessaloniki, Greece) for providing some of the strains studied.

### FUNDING INFORMATION

This work was funded by Association Vaincre la Mucoviscidose (Vaincre la Mucoviscidose) (RC20120600707).

The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

### REFERENCES

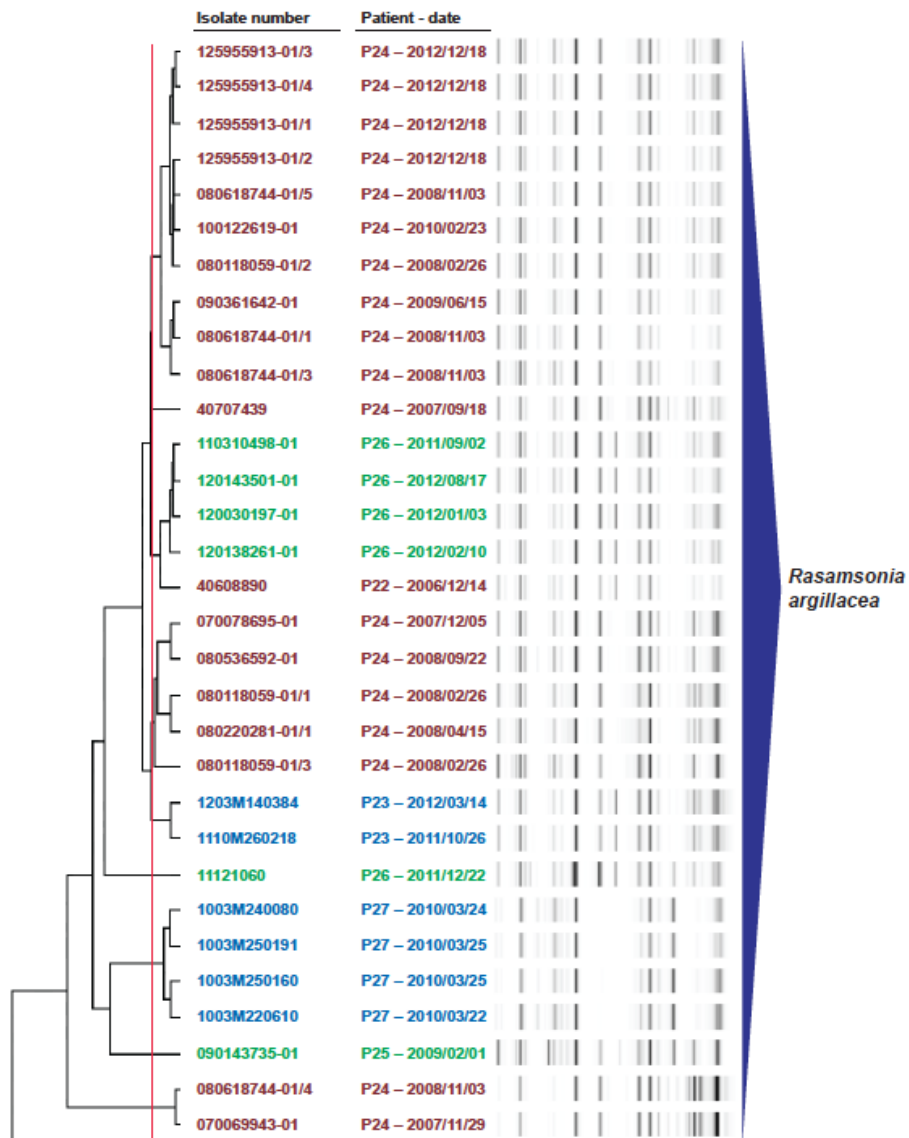
1. Giraud S, Favennec L, Bougnoux ME, Bouchara JP. 2013. *Rasamsonia argillacea* species complex: taxonomy, pathogenesis and clinical relevance. *Future Microbiol.* 8:967–978. doi: 10.2217/fmb.13.63.
2. Cimon B, Carrère J, Chazalotte JP, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP. 1999. Chronic airway colonization by *Penicillium emersonii* in a patient with cystic fibrosis. *Med. Mycol.* 37:291-293.
3. Grant DC, Sutton DA, Sandberg CA, Tyler RD Jr, Thompson EH, Romanelli AM, Wickes BL. 2009. Disseminated *Geosmithia argillacea* infection in a German shepherd dog. *Med. Mycol.* 47:221–226. doi: 10.1080/13693780802559023.

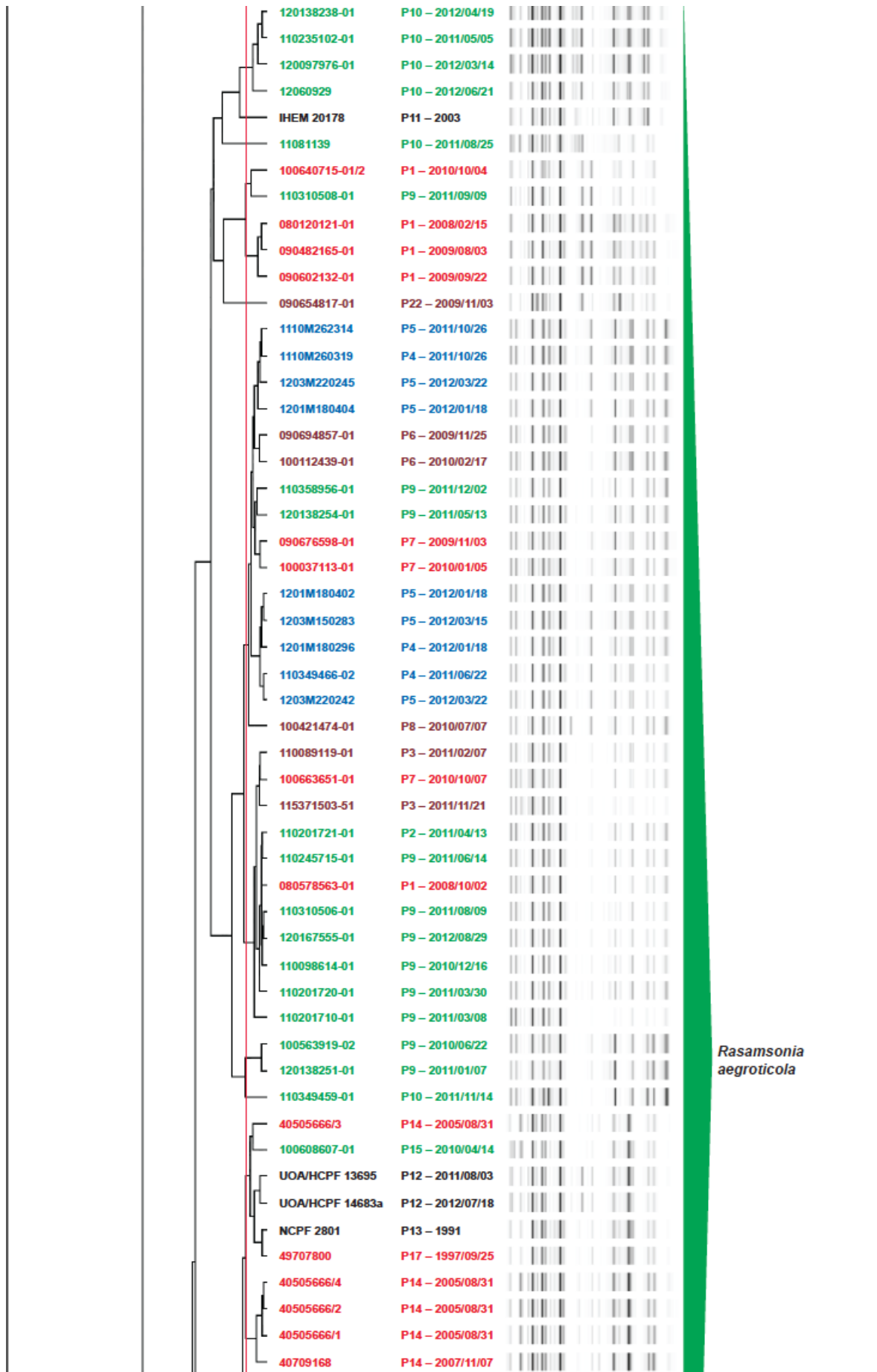
4. Salgüero R, Borman AM, Herrtage M, Benchekroun G, Abbondati E, Piola V, Vanhaesebrouck A. 2013. *Rasamsonia argillacea* mycosis in a dog: first case in Europe. *Vet. Rec.* 172:581. doi: 10.1136/vr.101373. Epub 2013 May 10.
5. Kawalilak LT, Chen AV, Roberts GR. 2015. Imaging characteristics of disseminated *Geosmithia argillacea* causing severe diskospondylitis and meningoencephalomyelitis in a dog. *Clin. Case Rep.* 3:901–906. doi: 10.1002/ccr3.372. Epub 2015 Sep 10.
6. Douglas AP, Chen SC, Slavin MA. 2016. Emerging infections caused by non-*Aspergillus* filamentous fungi. *Clin. Microbiol. Infect.* Jan 23. pii: S1198-743X(16)00027-6. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.011.
7. 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. doi: 10.1007/s10482-011-9647-1. Epub 2011 Oct 2.
8. 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. doi: 10.1128/JCM.02147-12. Epub 2012 Oct 17.
9. Machouart M, Garcia-Hermoso D, Rivier A, Hassouni N, Catherinot E, Salmon A, Debourgogne A, Coignard H, Lecuit M, Bougnoux ME, Blanche S, Lortholary O. 2011. Emergence of disseminated infections due to *Geosmithia argillacea* in patients with chronic granulomatous disease receiving long-term azole antifungal prophylaxis. *J. Clin. Microbiol.* 49:1681–1683. doi: 10.1128/JCM.02456-10. Epub 2011 Jan 26.
10. De Ravin SS, Challipalli M, Anderson V, Shea YR, Marciano B, Hilligoss D, Marquesen M, Decastro R, Liu YC, Sutton DA, Wickes BL, Kammeyer PL, Sigler L, Sullivan K, Kang EM, Malech HL, Holland SM, Zelazny AM. 2011. *Geosmithia argillacea*: an emerging cause of invasive mycosis in human chronic granulomatous disease. *Clin. Infect. Dis.* 52:e136–143. doi: 10.1093/cid/ciq250.
11. Ishiwada N, Takeshita K, Yaguchi T, Nagasawa K, Takeuchi N, Hishiki H, Watanabe A, Kamei K, Shimojo N. The first case of invasive mixed-mold infections due to *Emericella nidulans* var. *echinulata* and *Rasamsonia piperina* in a patient with chronic granulomatous disease. *Mycopathologia.* 2015 Nov 13. [Epub ahead of print]
12. Barton RC, Borman AM, Johnson EM, Houbraken J, Hobson RP, Denton M, Conway SP, Brownlee KG, Peckham D, Lee TW. 2010. Isolation of the fungus *Geosmithia argillacea* in sputum of people with cystic fibrosis. *J. Clin. Microbiol.* 48:2615–2617. doi: 10.1128/JCM.00184-10. Epub 2010 Apr 26.
13. 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. doi: 10.1128/JCM.00047-10. Epub 2010 May 12.

14. Marguet C, Favennec L, Matray O, Bertout S, Giraud S, Couderc L, Zouhair R, Leguillon C, Gargala G, Ballet JJ, Bouchara JP. 2012. Clinical and microbiological efficacy of micafungin on *Geosmithia argillacea* infection in a cystic fibrosis patient. *Med. Mycol. Case Rep.* 1:79–81. doi: 10.1016/j.mmcr.2012.08.004. eCollection 2012.
15. Labbé F, Babchia S, Evreux F, Chenal P. 2013. [Isolation of *Geosmithia argillacea* in a cystic fibrosis patient]. *J. Mycol. Méd.* 23:176–178. doi: 10.1016/j.mycmed.2013.05.003. Epub 2013 Jul 12. in French.
16. Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W. 2014. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med. Mycol.* 52:179–186.
17. Matos T, Cerar T, Praprotnik M, Krivec U, Pirs M. 2015. First recovery of *Rasamsonia argillacea* species complex isolated in adolescent patient with cystic fibrosis in Slovenia—case report and review of literature. *Mycoses* 58:506–510. doi: 10.1111/myc.12340. Epub 2015 Jun 9.
18. Valentin T, Neumeister P, Pichler M, Rohn A, Koidl C, Haas D, Heiling B, Asslaber M, Zollner-Schwetz I, Hoenigl M, Salzer HJ, Krause R, Buzina W. 2012. Disseminated *Geosmithia argillacea* infection in a patient with gastrointestinal GvHD. *Bone Marrow Transplant.* 47:734–736. doi: 10.1038/bmt.2011.149. Epub 2011 Jul 25.
19. Corzo-León DE, Satlin MJ, Soave R, Shore TB, Schuetz AN, Jacobs SE, Walsh TJ. 2015. Epidemiology and outcomes of invasive fungal infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients in the era of antifungal prophylaxis: a single-centre study with focus on emerging pathogens. *Mycoses* 58:325–336. doi: 10.1111/myc.12318. Epub 2015 Mar 24.
20. Doyon JB, Sutton DA, Theodore P, Dhillon G, Jones KD, Thompson EH, Fu J, Wickes BL, Koehler JE, Schwartz BS. 2013. *Rasamsonia argillacea* pulmonary and aortic graft infection in an immune-competent patient. *J. Clin. Microbiol.* 51:719–722. doi: 10.1128/JCM.02884-12. Epub 2012 Dec 12.
21. Sohn JY, Jang MA, Lee JH, Park KS, Ki CS, Lee NY. 2013. Isolation and identification of *Geosmithia argillacea* from a fungal ball in the lung of a tuberculosis patient. *Ann. Lab. Med.* 33:136–140. doi: 10.3343/alm.2013.33.2.136. Epub 2013 Feb 21.
22. 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.* 51:603–613. doi: 10.3109/13693786.2013.770606. Epub 2013 Mar 5.
23. Del Chierico F, Masotti A, Onori M, Fiscarelli E, Mancinelli L, Ricciotti G, Alghisi F, Dimiziani L, Manetti C, Urbani A, Muraca M, Putignani L. 2012. MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. *J. Proteomics* 75:3314–3330. doi: 10.1016/j.jprot.2012.03.048. Epub 2012 Apr 4.

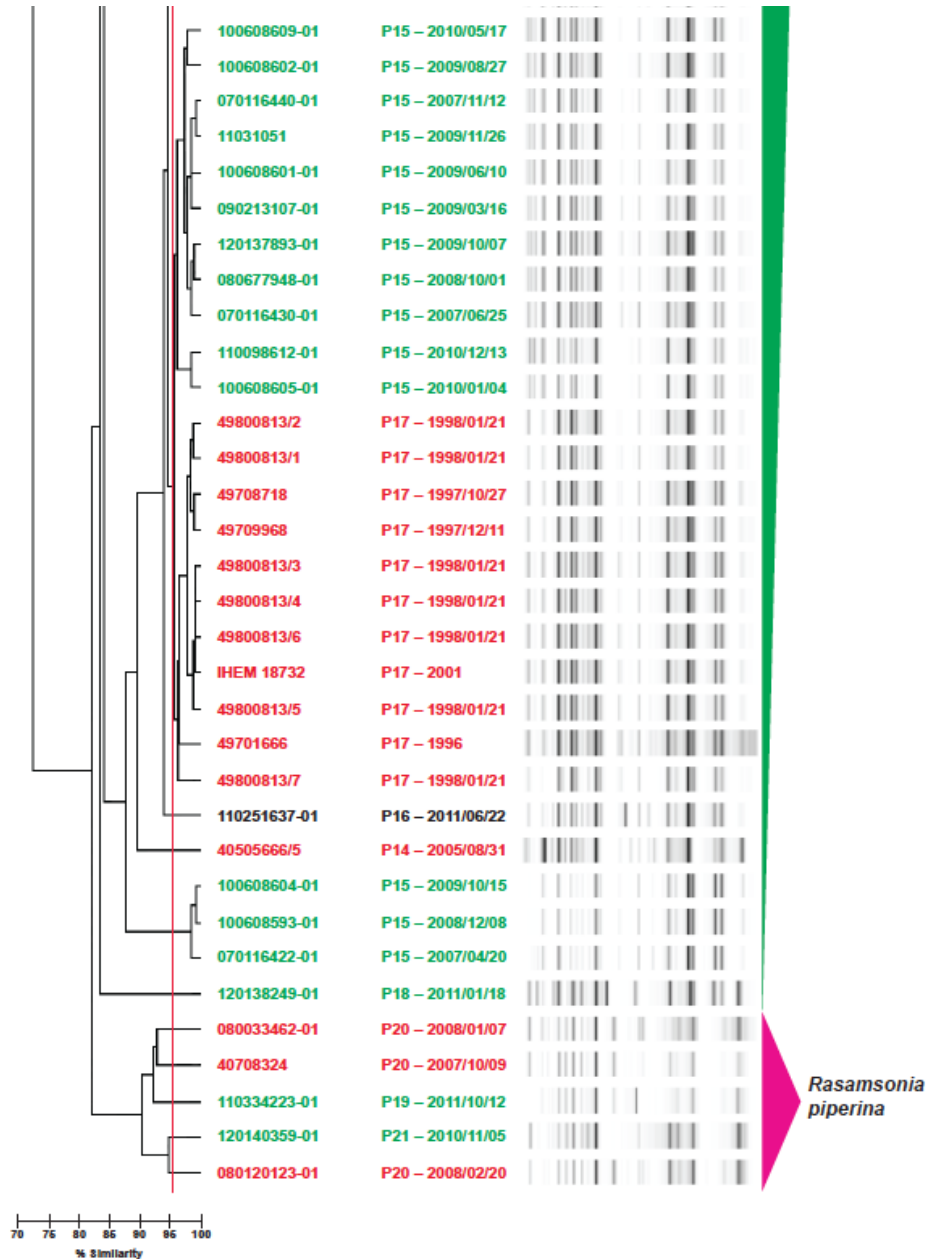
24. Wise MG, Healy M, Reece K, Smith R, Walton D, Dutch W, Renwick A, Huong J, Young S, Tarrand J, Kontoyiannis DP. 2007. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J. Med. Microbiol.* 56:778–787.
25. Healy M, Reece K, Walton D, Huong 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.
26. Hansen D, Healy M, Reece K, Smith C, Woods GL. 2008. Repetitive-sequence-based PCR using the DiversiLab system for identification of *Aspergillus* species. *J. Clin. Microbiol.* 46:1835–1839. doi: 10.1128/JCM.00956-07. Epub 2008 Mar 26.
27. Pounder JI, Williams S, Hansen D, Healy M, Reece K, Woods GL. 2005. Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the Diversilab system for identification of commonly encountered dermatophytes. *J. Clin. Microbiol.* 43:2141–2147.
28. Pounder JI, Hansen D, Woods GL. 2006. Identification of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Coccidioides* species by repetitive-sequence-based PCR. *J. Clin. Microbiol.* 44:2977–2982.
29. Matray O, Mouhajir A, Giraud S, Godon C, Gargala G, Labbé F, Rougeron A, Ballet JJ, Zouhair R, Bouchara JP, Favennec L. 2015. Semi-automated repetitive sequence-based PCR amplification for species of the *Scedosporium apiospermum* complex. *Med. Mycol.* Oct 19. pii: myv080. [Epub ahead of print]
30. 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.
31. Rougeron A, Schuliar G, Leto J, Sitterlé E, Landry D, Bougnoux ME, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S. 2015. Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* species complex. *Environ. Microbiol.* 17:1039–1048.
32. 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.
33. Fillaux J, Brémont F, Murriss M, Cassaing S, Rittié JL, Tétu L, Segonds C, Abbal M, Bieth E, Berry A, Pipy B, Magnaval JF. 2012. Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand. J. Infect. Dis.* 44:842–847.
34. Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. 2010. Sputum *Candida albicans* presages FEV<sub>1</sub> decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest* 138:1186–1195.

35. Renders NH, Sijmons MA, van Belkum A, Overbeek SE, Mouton JW, Verbrugh HA. 1997. Exchange of *Pseudomonas aeruginosa* strains among cystic fibrosis siblings. Res. Microbiol. 148:447–454.
36. Krzewinski JW, Nguyen CD, Foster JM, Burns JL. 2001. Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* from patients with cystic fibrosis. J. Clin. Microbiol. 39:3597–3602.
37. Abdul Wahab A, Taj-Aldeen SJ, Hagen F, Diophode S, Saadoon A, Meis JF, Klaassen CH. 2014. Genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis siblings in Qatar using AFLP fingerprinting. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 33:265–271.
38. Harik NS, Com G, Tang X, Melguizo Castro M, Stemper ME, Carroll JL. 2015. Clinical characteristics and epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in children with cystic fibrosis from a center with a high MRSA prevalence. Am. J. Infect. Control. Dec 9. pii: S0196-6553(15)01070-6. doi: 10.1016/j.ajic.2015.10.015.
39. 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.
40. 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.









**Supplementary figure 1**

Phylogenetic tree generated from the analysis of data obtained with the whole set of isolates using the Mold DNA fingerprinting primer kit. Data were analyzed with the unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) using the DiversiLab Healthcare software. Isolates collected from patients followed-up in Angers, Giens, Paris-Necker and Rouen hospitals are highlighted in brown, red, blue and green.

### Étude 3 : Écologie des espèces du genre *Scedosporium* au Maroc.

#### (Manuscrit en préparation)

Les espèces du genre *Scedosporium* sont des pathogènes opportunistes émergents surtout dans la mucoviscidose, elles se situent au deuxième rang parmi les champignons filamenteux isolés du tractus respiratoire des patients atteints de cette maladie génétique (Cimon *et al.*, 2000; Horré *et al.*, 2009 ; Harun *et al.*, 2009; Masoud-Landgraf *et al.*, 2014). D'autre part, en raison de leur thermotolérance, de leur aptitude à la dissémination en cas d'immunodéficience et de leur faible sensibilité naturelle aux antifongiques actuels, les espèces du genre *Scedosporium* peuvent être à l'origine d'infections disséminées souvent fatales en cas de transplantation pulmonaire (Castiglioni *et al.*, 2002; Symoens *et al.*, 2006; Sahi *et al.*, 2007; Morio *et al.*, 2010; Hirschi *et al.*, 2012; Thomson *et al.*, 2015). Une meilleure connaissance des niches écologiques de ces champignons est donc nécessaire pour définir des mesures préventives visant à réduire le niveau d'exposition des patients à ces pathogènes et ainsi le risque de colonisation et d'infection.

Ces champignons semblent être ubiquistes dans les zones tempérées, mais leur habitat naturel est inconnu (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008). En effet, ces champignons sont peu fréquents dans l'environnement, et leur présence est souvent liée aux activités humaines. Ce sont des espèces thermotolérantes qui peuvent également tolérer des pressions partielles en oxygène faibles et des concentrations salines élevées (5%) (Dzawachiszwili *et al.*, 1964; de Hoog *et al.*, 1994). De ce fait, les *Scedosporium* peuvent survivre, et même croître, dans des environnements pollués avec une faible aération et des pressions osmotiques élevées (Guarro *et al.*, 2006; Cortez *et al.*, 2008).

Dans ce contexte, nous nous sommes proposés d'étudier l'écologie et la distribution des espèces du genre *Scedosporium* dans différents biotopes au Maroc. 99 échantillons de sol ont été collectés dans différents biotopes plus ou moins impactés par les activités humaines : des prélèvements ont été réalisés dans des milieux naturels préservés comme la forêt de Maamoura et le parc national d'Ifrane (n = 10) et les plages de la côte atlantique nord du Maroc (n = 13). Des prélèvements ont été aussi collectés dans des milieux urbains impactés par les activités humaines, à savoir les habitats intérieurs (n = 12), les jardins publics (n = 10), les parcs piétonniers (n = 10), les pépinières (n = 12), les bordures de route (n = 10), les quais de deux rivières polluées à Fès et Meknès (n = 10) et des zones fortement polluées comme les boues de la station d'épuration des eaux usées et la décharge publique de la ville de Meknès (n = 12).

Les échantillons de sol ont été analysés par mise en culture sur le milieu de culture Scedo-Select III, milieu semi-sélectif développé au laboratoire pour la détection des espèces du genre *Scedosporium* (Pham *et al.*, 2015). Trois boîtes de culture ont été inoculées pour chaque échantillon de sol, puis incubées à 37°C. Par la suite, les différents types de colonies ont été étudiés (dénombrement des colonies et identification par les caractéristiques

macroscopiques et microscopiques). Les colonies de *Scedosporium* ont été isolées sur milieu YPDA additionné de cycloheximide. Enfin, l'identification précise des espèces a été réalisée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF dans le laboratoire du Dr. Marie-Elisabeth Bougnoux.

Parallèlement, différents paramètres physico-chimiques ont été évalués pour chaque échantillon de sol afin de caractériser l'habitat des espèces du genre *Scedosporium*. Sept paramètres ont été étudiés, à savoir la valeur du pH, la conductivité électrique, la teneur en azote total, la teneur en matières organiques, la dureté calcique (teneur en carbonate de calcium CaCO<sub>3</sub>) et les taux de potassium et de phosphore.

Sur les 99 prélèvements de sol collectés au Maroc, 48 étaient positifs pour la présence de *Scedosporium*. 90% des sites prélevés sur les berges des rivières polluées étaient positifs, 75% des sites dans les habitats intérieurs et dans les boues de la station d'épuration et la décharge publique, 58% dans les pépinières, 50% dans les parcs piétonniers et dans les bordures de routes et 30% dans les jardins publics. Par contre, seul un prélèvement en forêt était positif et aucun des 13 prélèvements réalisés sur les plages ne s'est avéré positif pour *Scedosporium*. D'autre part, les concentrations les plus élevées en champignons du genre *Scedosporium* ont été observées pour les prélèvements collectés dans la station d'épuration et la décharge publique, avec une densité moyenne dans les sites positifs de 318 UFC/g de sol, suivis des prélèvements réalisés en bordure de route avec une densité de 183 UFC/g et les berges de rivières polluées (125 UFC/g). En outre, bien que 75% des sites étaient positifs dans les habitats intérieurs, la densité moyenne en *Scedosporium* spp. était seulement de 28 UFC/g de sol.

Dans cette étude, nous avons pu collecter 130 isolats de *Scedosporium* ; l'identification de ces isolats à l'espèce a été réalisée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. *Scedosporium apiospermum sensu stricto* était l'espèce la plus abondante avec 74 isolats (57%), suivi par *S. boydii* avec 23 isolats et *S. aurantiacum* avec 21 isolats. 12 isolats se sont avérés appartenir à l'espèce *S. dehoogii*, alors qu'aucun isolat de *S. minutisporum* n'a été identifié.

La distribution de ces espèces varie entre les différents biotopes. *Scedosporium apiospermum* était présent dans tous les biotopes en milieu urbain avec un pourcentage des sites positifs qui varie de 17% dans les pépinières à 80% en bordure de route ; *S. boydii* était lui aussi présent dans tous les biotopes en milieu urbain à l'exception des jardins publics et avec un pourcentage de sites positifs de 25% maximum dans les pépinières ; *S. aurantiacum* était plus abondant sur les berges de rivières polluées avec 40% des sites positifs ; *S. dehoogii* était la seule espèce isolée en forêt, et était également présent dans les habitats, la décharge publique et les berges de rivières polluées.

Pour caractériser l'habitat des espèces du genre *Scedosporium*, nous avons déterminé sept paramètres physico-chimiques pour chacun des échantillons. Ces champignons ont été retrouvés dans une large gamme de pH comprise entre 5,8 et 8,5. Il convient de signaler que plus de 93% des sites positifs présentaient un pH compris entre

6,25 et 7,85. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus dans d'autres études et soulignent le rôle important que joue ce paramètre sur la présence des espèces du genre *Scedosporium* (Kaltseis *et al.*, 2009 ; Rougeron *et al.*, 2014 ; Luplertlop *et al.*, 2016).

Pour la conductivité électrique, les sites positifs pour *Scedosporium* spp. avaient des valeurs de conductivité comprises entre 0,09 mS/cm et 6,23 mS/cm, néanmoins 56% des sites positifs avaient des valeurs de conductivité très basses, entre 0,09 et 0,5 (sols non salés). Finalement, il semble que les *Scedosporium* spp. ont une affinité pour les sols riches en matière organique : près de 90% des sites positifs avaient des teneurs en matière organique comprises entre 2,02% et 17,5%. Enfin, nous n'avons pas pu établir de lien entre la présence de *Scedosporium* spp. et la teneur en matière azotée totale ou en carbonate de calcium (CaCO<sub>3</sub>), de même qu'avec les taux de potassium et de phosphore.

La niche naturelle des espèces du genre *Scedosporium* reste inconnue, ces champignons ont déjà été isolés dans différents biotopes en Europe, notamment en France (Rougeron *et al.*, 2014), en Autriche et aux Pays-Bas (Kaltseis *et al.*, 2009), mais aussi en Australie (Harun *et al.*, 2010) et en Thaïlande (Luplertlop *et al.*, 2016). Dans toutes ces études, les environnements impactés par les activités humaines semblent être les principaux réservoirs pour ces champignons saprophytes, ce qui est en accord avec les résultats que nous avons obtenus. En outre, nos résultats montrent que *S. apiospermum* est l'espèce la plus fréquente dans les sols collectés au Maroc, espèce qui était aussi la plus abondante en Autriche (58,7%-77,7%) et en Thaïlande (73%), alors qu'en France, cette espèce était modérément retrouvée (20%) et l'espèce dominante était *S. dehoogii* (40%). En Australie, aucun isolat n'a été identifié comme *S. apiospermum* et *S. aurantiacum* était l'espèce abondante dans ce pays.

La présente étude rapporte le premier cas d'isolement des espèces du genre *Scedosporium* dans l'environnement au Maroc. Ces champignons sont ubiquistes dans le sol et leur présence est étroitement associée avec le degré des activités humaines.

***Scedosporium* species in soils from Rabat-Sale-Kenitra and Fez-Meknes regions, Morocco**

**Abstract**

Species of the genus *Scedosporium* are emerging pathogens causing various infections, including disseminated infections in severely immunocompromised patients because of their thermotolerance and of their limited susceptibility to current antifungals. Preventive measures aiming to reduce the risk of exposure to these fungi therefore should be proposed, but require a better knowledge on the ecology of these fungi and of the sources of contamination of the patients. In this context, 99 soil samples from the Rabat-Sale-Kenitra and Fez-Meknes regions in Morocco were analyzed. Samples were inoculated on the highly selective Scedo-Select III culture medium, and seven chemical parameters were measured in parallel, including pH, electrical conductivity, potassium and phosphorus amounts, and the nitrogen, total organic matter and calcium carbonate contents. *Scedosporium* species were detected from 48 of the samples, with the highest density found in wastewater treatment plants and landfills, roadsides and polluted riverbanks. *Scedosporium apiospermum* was the most common species, followed by *S. boydii* and *S. aurantiacum*. Regarding the chemical parameters of the soils, no significant differences were observed between positive and negative samples when each parameter was considered individually. Nevertheless, the presence of *Scedosporium* species was mainly associated with a low electrical conductivity, a pH range of 6.3 to 8.1 and a high organic matter content. Together these results confirmed the impact of human activities on the ecology of *Scedosporium* species, and demonstrated the relatively high occurrence of these fungi in soils in Morocco.

### Introduction

Usually living as saprophytes, filamentous fungi of the genus *Scedosporium* may cause in human a wide variety of infections affecting both the immunocompetent and immunocompromised individuals (Giraud and Bouchara 2014; Ramirez-Garcia *et al.* 2017). Various localized infections are described such as subcutaneous mycetomas, bone and joint infections, or keratitis resulting from traumatic inoculation of some fungal elements, for example because of gardening or traffic accidents, whereas disseminated infections may occur in severely immunocompromised patients like patients with AIDS and bone marrow or solid organ transplant recipients. Nevertheless, a particular attention has been paid to these fungi during the past decade, because of their worldwide recognition as significant pathogens in patients with cystic fibrosis (CF).

With 70000 to 100000 people affected in the world, CF is the major genetic inherited disease in Caucasian populations. Several organs are involved in this disease, but prognosis essentially depends on the severity of the lesions of the lungs, since the respiratory tract of the patients is often colonized by various microorganisms, causing respiratory infections which are the major cause of morbidity and mortality in patients with CF. Bacteria, mainly *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*, and the filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* remain by far the most common microorganisms responsible for these infections. However, a regularly increasing number of fungal species has been described during the past three decades, but most studies that have been conducted on fungal respiratory infections in CF demonstrated the genus *Scedosporium* as ranking the second among the filamentous fungi colonizing the CF lungs (Cimon *et al.*, 2000; Blyth *et al.*, 2010; Horr  *et al.*, 2011; Masoud-Landgraf *et al.*, 2014; Sedlacek *et al.*, 2015). In these patients, chronic colonization of the airways by *Scedosporium* species is usually asymptomatic. Nevertheless, some respiratory infections are also reported like bronchitis and allergic bronchopulmonary mycoses. In addition, because of their thermotolerance and of their limited susceptibility to current antigungals, these fungi may be responsible for severe and often fatal disseminated infections in case of immunodeficiency, particularly after lung transplantation which remains the ultimate treatment of these patients (Castiglioni *et al.* 2002; Husain *et al.* 2005; Symoens *et al.* 2006; Sahi *et al.* 2007; Morio *et al.* 2010). Therefore all efforts should be paid to detect these fungi from respiratory secretions as early as possible, particularly at registration on the lung transplantation waiting list. Likewise, preventive measures aiming to reduce the risk of contamination of the patients and of colonization of the airways by these fungi are needed. However, this requires a better knowledge on the ecology of these fungi in order to identify the potential sources of contamination.

Since the first description of these fungi, a huge number of papers have been published reporting their isolation from various substrates, mainly nutrient-rich substrates, such as soil and manure of livestock, poultry or cattle (for a review see Rougeron *et al.*, 2017). However, most of these studies were published before the taxonomic revisions of the *Scedosporium* genus. For instance, with the works from Gilgado *et al.* (2005, 2008, 2010), *Scedosporium*

*apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* (initially considered its sexual state) were shown to be distinct species and other species were described. Today, the genus *Scedosporium* comprises 10 species, *i.e.* *S. aurantiacum*, *S. cereisporum*, *S. deficiens*, *S. dehoogii*, *S. minutisporum*, and species of the *S. apiospermum* complex which comprises *S. angustum*, *S. apiospermum sensu stricto*, *S. boydii*, *S. ellipsoideum*, *S. fusioideum* (Ramirez-Garcia *et al.*, 2017).

Recently highly selective culture media have been developed like Sce-Sel+ or Scedo-Select III (Rainer *et al.*, 2008; Pham *et al.*, 2015), and several large scale studies dealing with the ecology of these pathogens and the distribution of the different *Scedosporium* species have been conducted, mainly in Europe, including France (Rougeron *et al.*, 2015), Austria and the Netherlands (Kaltseis *et al.*, 2009), but also in Australia (Harun *et al.*, 2010), Thailand (Luplertlop *et al.*, 2016) and Chile (Alvarez and Sanhueza, 2016). However, such studies have never been performed in Africa, and to the best of our knowledge, only sporadic isolations of *Scedosporium* sp. have been reported until now in Nigerian soils (Nweze and Okafor, 2010), and in Morocco, from the sand of two beaches in Casablanca (Soussi Abdallaoui *et al.*, 2007) and recently from soil samples collected from Argane (*Argania spinosa*) forests in different localities of Souss-Massa region (Hallouti *et al.*, 2017). Here we report the results of an environmental study performed in the Rabat-Sale-Kenitra and Fez-Meknes regions, two of the twelve administrative divisions of Morocco, which comprise four of the ten most important cities of the country.

## Materials and Methods

### *Soil sampling*

This study was conducted in the Rabat-Sale-Kenitra and Fez-Meknes regions which are located in the north of Morocco. The former, along the Atlantic ocean, presents a mild, temperate Mediterranean climate with cool winters and warm summers, while various climates can be seen in the latter : (i) a continental climate in the northern part, very hot and very dry in summer and cold and humid in winter; (ii), a cold and humid climate in the middle Atlas, very cold and very snowy in winter and temperate in summer; and (iii), a semi-arid climate in the high hills of Boulemane, where the average rainfall does not exceed 250 mm, very cold and snowy in winter and several days without thawing.

Ninety nine sampling sites were selected, representing various biota more or less impacted by human activities (Supplemental Figure 1). Some samples were taken in protected natural habitats such as the forests of Maamoura and in the national park of Ifrane (n = 10) or beaches around Rabat and Kenitra (n = 13). Other sampling sites were located in the main cities of these regions, including urban parks (n = 10), roadsides (n = 10) and the banks of two polluted rivers in Fez and Meknes (n = 10). Samples from the indoor environment (mainly potted plants or garden in individual houses; n = 12), plant nurseries (n = 12) and pedestrian city parks (n = 10) were also analyzed, while others were taken from highly

polluted areas such as sewage sludge from wastewater treatment plants and the soil from a public landfill in Meknes (n = 12).

For each sampling site, plots of one square meter were defined. After clearing the surface from plant debris, soil samples were collected with a spatula for up to 15 cm in depth in three to five collection spots until reaching about 500 g of soil. Samples were secured in plastic bags to avoid external contamination until chemical and mycological analysis.

### *Soil chemical analysis*

Seven chemical characteristics were determined for each soil sample after homogenization. pH of the samples was measured with a glass electrode using a soil-to-water ratio of 1:2.5. Briefly, three aliquots (20 g) of dried and sieved samples were resuspended in distilled water, and the obtained suspensions were stirred twice for 10 min at 10 min interval. Stirring was maintained during pH measurement and mean values were calculated for each sample. 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.

The electrical conductivity, which reflects the amount of soluble ions in soil, was quantified by measuring the electrical resistance of a 1:5 soil-to-water suspension (Rayment and Higginson, 1992).

The total organic matter content was determined by the Walkley-Black method (Walkley and Black 1934) by treatment of an aliquot of the soil samples with concentrated  $\text{H}_2\text{SO}_4$  and  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  for 18 hr. After heating and cooling at room temperature, the unreacted  $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  in was determined spectrophotometrically at 610 nm.

The total and active calcium carbonate content was determined using a Bernard's calcimeter after addition of HCl 6 N (Lamas *et al.*, 2005). Total nitrogen content was measured by the Kjeldhal method. Finally, the potassium amount was determined by flame photometry and the available phosphorus amount by the Olsen method (Olsen *et al.*, 1954).

### *Isolation of *Scedosporium* species*

All soil samples were inoculated on the Scedo-Select III culture medium which was developed in our laboratory (Pham *et al.*, 2015) and which demonstrated its high selectivity for *Scedosporium* species in previous environmental studies (Rougeron *et al.*, 2015; Luplertlop *et al.*, 2016). To do this, soil samples (5 g) were mixed vigorously with 5 mL of sterile distilled water, and the obtained suspensions were filtered through a 100- $\mu\text{m}$ -porosity nylon mesh. The filtrates were then centrifuged at 4500 rpm for 5 min. Afterwards, the pellets were resuspended into 5 mL of sterile distilled water, and 100  $\mu\text{L}$  of the obtained suspensions were inoculated in triplicate on Scedo-Select III agar plates which comprises in g/L (4-hydroxybenzoate, 0.9; ammonium sulphate, 5; potassium dihydrogenophosphate, 1.25; magnesium sulphate, 0.625; ferrous sulphate, 0.01; dichloran, 0.002; benomyl, 0.008; chloramphenicol, 0.5; and agar, 20). All agar plates were incubated at 37°C for 7 days and examined daily for fungal growth.



The different colony types recovered on each plate were enumerated, described macroscopically and examined by light microscopy after mounting on glass slides in lactic blue stain. Fungi were identified by their macroscopic and microscopic features according to standard description. Colonies of *Scedosporium* species were subcultured on plates of Yeast extract-Peptone-Dextrose Agar (YPDA containing in g/L: yeast extract, 5; peptone, 10; glucose, 20; and agar, 20) pH 7.2 supplemented with chloramphenicol 0.5 g/L and cycloheximide 0.5 g/L. After checking the purity of the colonies, *Scedosporium* isolates were preserved on cryobeads at -20°C for further analysis.

### *Species identification in the Scedosporium genus*

For species identification, preserved isolates were subcultured on YPDA plates, and after checking the purity, identified by matrix assisted laser desorption ionization – time of flight (MALDI-TOF) / mass spectrometry on the Andromas equipment as described by Sitterlé *et al.* (2014) with slight modifications. In this aim, the colony surface was scraped by swabbing and mixed with 20 µL of acid formic (80%). Aliquots (1.5 µL) of the obtained suspensions were then deposited on wells of a target plate and after drying, co-cristallized with 1 µL of matrix solution HCCA (saturated solution of  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid, 50% acetonitrile, 2.5% trifluoroacetic acid). All isolates were analyzed in duplicate wells and the obtained spectra were compared with the reference spectral fingerprints in the Andromas database. For some isolates, species identification was also performed by sequencing part of the beta-tubulin gene as described by Rougeron *et al.* (2015).

### *Growth of Scedosporium on agar-based culture medium with acid pH*

To check the influence of pH on the recovery of *Scedosporium* species, growth of some isolates was evaluated by measuring the diameter of the colonies every day for three weeks on agar-based yeast nitrogen base (YNB) culture media prepared in water (pH 5.4) or with Tris/HCl buffer pH 7.4, and results were compared to those obtained on YPDA plates.

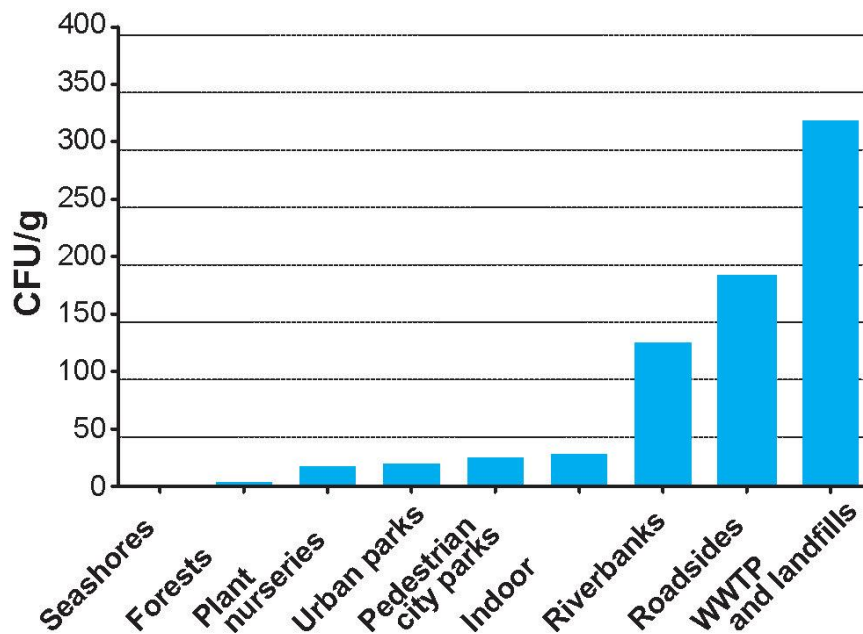
### *Statistical analysis*

Soil samples were grouped according to the presence or absence of *Scedosporium* species by cultures. For each chemical parameter investigated, median and first and third quartiles were determined using the SPSS 17.0 software, and data were compared using the Student's t-test with p value < 0.005 for significance. Multiple linear regression analysis was also performed using the SAS/STAT® 9.1 software to determine the relationships between the different variables and the presence of *Scedosporium* species.

## Results

### *Occurrence of Scedosporium spp. in soils from Morocco*

99 soil samples from the Rabat-Salé-Kenitra and Fez-Meknes regions were analyzed by triplicate cultivation on the highly selective Scedo-Select III culture medium containing 4-hydroxybenzoate as the sole carbon and energy source searching for *Scedosporium* species. *Scedosporium* species were detected from 48 of these samples, representing a total number of 1084 colonies. As shown in Figure 1, *Scedosporium* species were found from all area types apart from seashores. However, the highest density rates of *Scedosporium* isolates were seen from highly polluted biomes, *i.e.* WWTP and landfills (mean value in positive samples: 318 CFU/g; range: 10 to > 1000), followed by roadsides (mean: 183 CFU/g; range: 7 to 840) and polluted riverbanks (mean: 125 CFU/g; range: 10 to 557). Cultivation of soil samples from plant nurseries, urban parks, pedestrian city parks and indoor environments yielded similar amounts of *Scedosporium* colonies (range: 3 to 80 CFU/g), whereas only one *Scedosporium* isolate was recovered from forest soils.



**Figure 1:** Density of *Scedosporium* isolates in soils from Rabat-Sale-Kenitra and Fez-Meknes regions, Morocco, according to the biome studied.

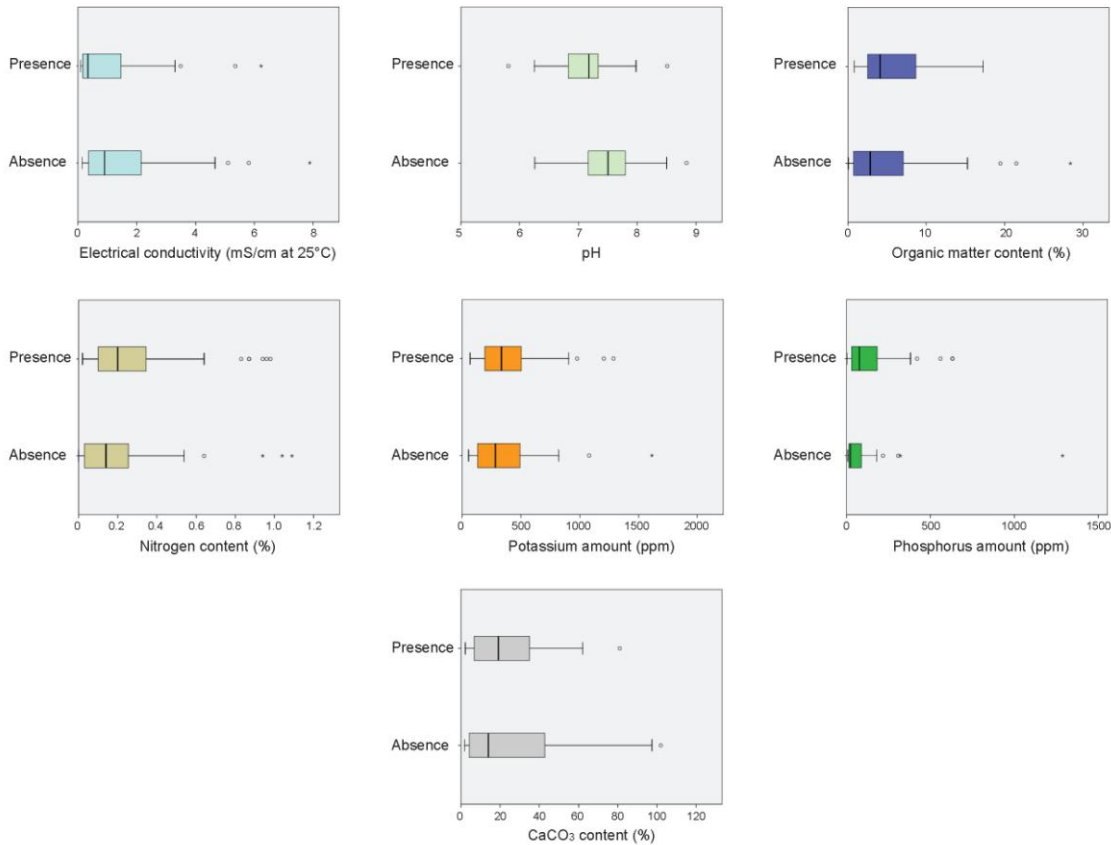
Results are expressed in CFU per g of soil. CFU: Colony Forming Unit. WWTP: Wastewater treatment plant.

The impact of human activities on the detection of *Scedosporium* species was also evidenced by determination of the number of *Scedosporium*-culture positive samples in the different biomes studied (Supplemental Figure 2). 90% and 75% of the samples from banks of polluted rivers, and WWTP and landfills, respectively, were culture positive for *Scedosporium* species. About half of the samples from plant nurseries, roadsides, or pedestrian city parks, revealed the presence of *Scedosporium* isolates, as well as one third of the samples from urban parks. By contrast, among soil samples from protected areas, including 13 samples from seashores and 10 from forests, only one revealed the presence of *Scedosporium* sp. Interestingly, these fungi were also commonly found in indoor environments (75% of the samples).

### *Influence of chemical parameters of the soils on the presence of Scedosporim species*

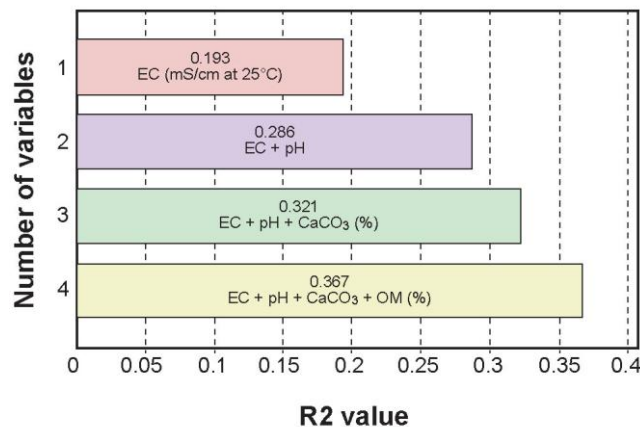
Seven chemical parameters were determined on the soil samples in order to explain the presence of *Scedosporium* species, including electrical conductivity, pH, total organic matter, calcium carbonate and nitrogen contents, and the potassium and phosphorus amounts. Soil samples were grouped according to the presence or absence of *Scedosporium* species and data obtained for each parameter were compared between the two series of samples. As illustrated in Figure 2, distribution of the data for the total organic matter or nitrogen contents, as well as for the potassium and phosphorus amounts, was wider for *Scedosporium*-culture positive samples, and conversely narrower for the electrical conductivity, pH and the calcium carbonate content. Nevertheless, whatever the parameter considered, statistical analysis did not reveal significant differences between *Scedosporium*-culture positive and *Scedosporium*-culture negative samples.

A multiple linear regression analysis therefore was performed in order to define relationships between these parameters and the presence of *Scedosporium* species in the soil samples, according to the assumption parsimony (Figure 3). The electrical conductivity explained the presence of *Scedosporium* species in 19.3% of the samples. Taking together the electrical conductivity and pH of positive samples, the presence of *Scedosporium* species was explained for 28.6% of the samples, and in 36.7% of the samples when two additional parameters were considered, that are the calcium carbonate and the total organic matter contents.



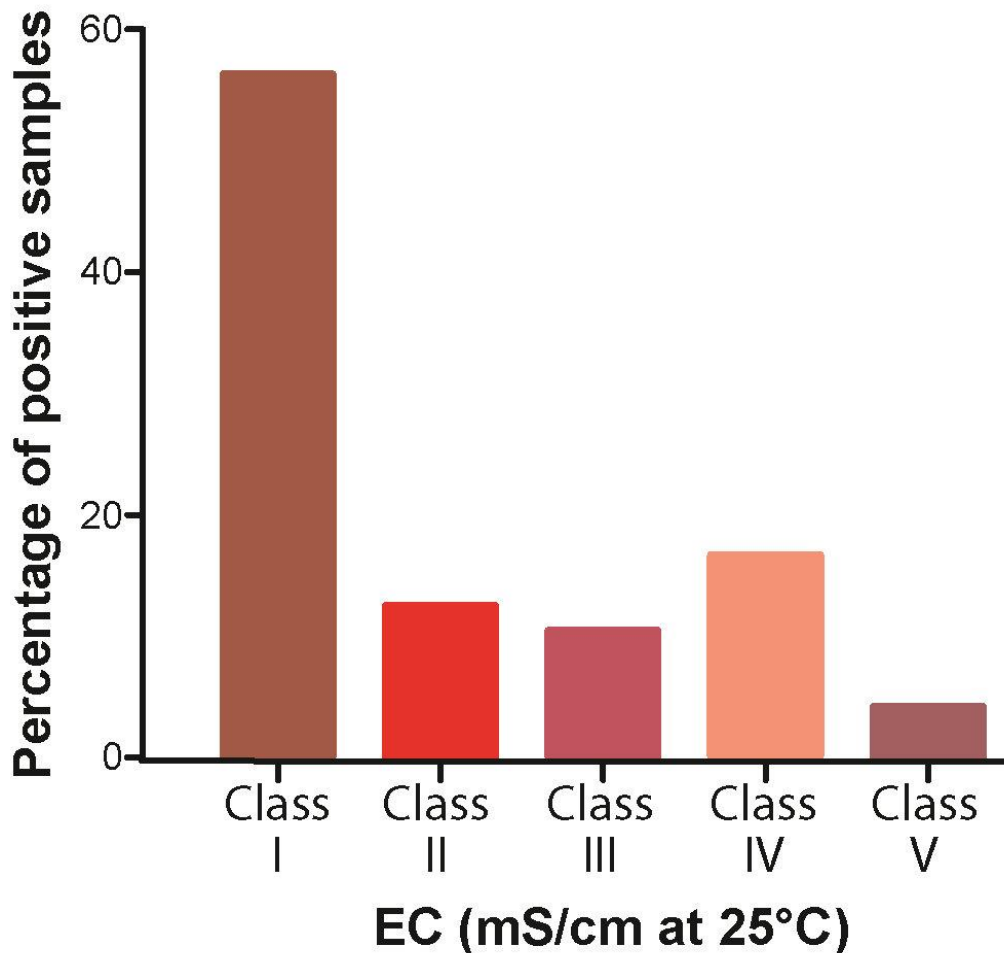
**Figure 2:** Box plot representation of the distribution of the data obtained for the different chemical parameters of the soil samples according to the presence or absence of *Scedosporium* species in cultures.

Central lines in each box indicate the median, and the lower and upper rims represent the first and third quartiles, whereas the whiskers extend to the 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles. Outliers are shown by circles if values are up to three times the height of the boxes or by asterisks for higher values (extreme outliers).



**Figure 3:** Multiple linear regression analysis of the presence of *Scedosporium* species in soil samples from Rabat-Sale-Kenitra and Fez-Meknes regions, Morocco.

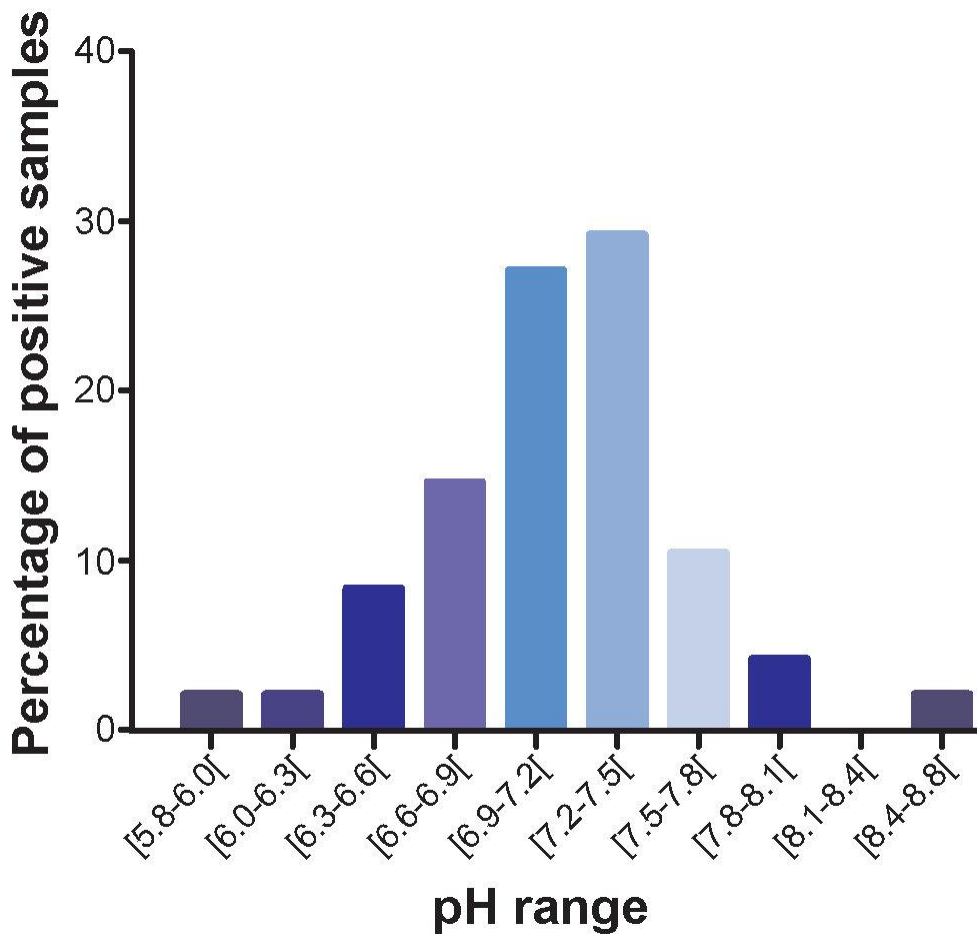
Figure 4 illustrates the distribution of electrical conductivity values in *Scedosporium*-culture positive samples. Soil samples were divided into five classes according to the electrical conductivity, but a large majority of positive samples belonged to class I which corresponded to an electrical conductivity below 0.5 mS/cm at 25°C (no salty samples). Similar numbers of positive samples were found for class II to IV, whereas a very few number belonged to class V (electrical conductivity higher than 4 mS/cm; highly salty soils).



**Figure 4:** Influence of soil conductivity on the presence of *Scedosporium* species in soil samples.

Samples were divided into five classes according to their electrical conductivity which reflects the total ion content: class I, from 0 to 0.5 mS/cm at 25°C (no salts); class II, from 0.5 to 1 mS/cm (few salts); class III, from 1 to 2 mS/cm (salty samples); class IV, from 2 to 4 mS/cm (very salty samples); and class V, > 4 mS/cm (highly salty samples).

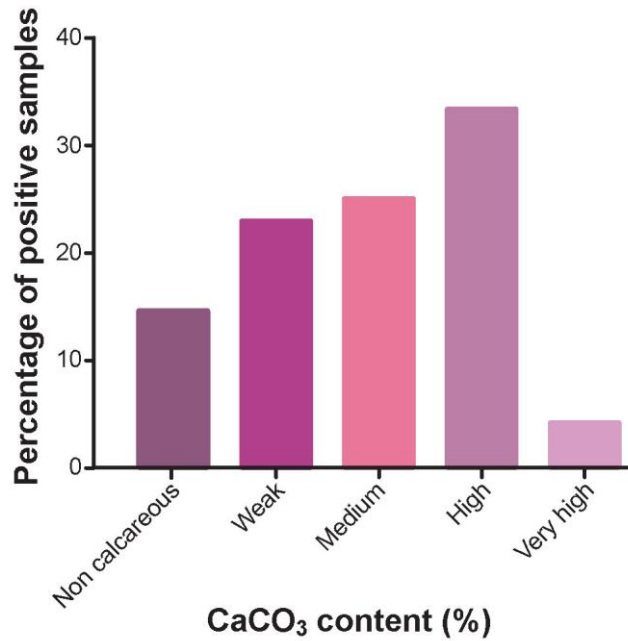
Soil samples were divided into ten classes according to their pH (Figure 5). As expected, almost all positive samples exhibited a pH within the range of 6.3 to 8.1, with a maximum number of samples showing a neutral pH comprised between 6.9 to 7.5.



**Figure 5:** Influence of pH on the presence of *Scedosporium* species in soil samples.

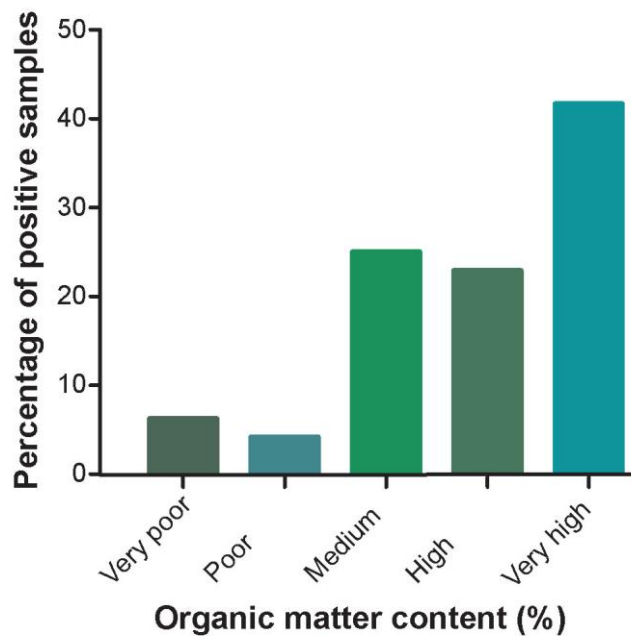
Data were divided into classes whose number was determined using the square root of the number of pH values. Theoretical amplitude of each class was determined in percentage by the global addition of positive samples.

The influence of the total calcium carbonate (Figure 6) and organic matter (Figure 7) contents was less pronounced. Most of the positive samples exhibited a weak to high calcium carbonate content (from 5 to 50%) and a medium to very high organic matter content (from 2 to 5%). *Scedosporium* species seemed to be unable to multiply in soils samples with a very high calcium carbonate content (> 50%) or with a low to very low organic matter content (< 2%). Only 4.2% of the samples with a very high calcium carbonate content were culture-positive for *Scedosporium* species. Likewise, *Scedosporium*-positive samples represented only 5 to 8% of the samples with a very low or low organic matter content, whereas they were 40% among nutrient-very rich samples.



**Figure 6:** Influence of the total calcium carbonate content on the presence of *Scedosporium* species in soil samples.

No calcareous:  $\text{CaCO}_3 \leq 5\%$  ; Weak:  $5 < \text{CaCO}_3 \leq 12,5\%$  ; Medium:  $12,5 < \text{CaCO}_3 \leq 25\%$  ; High:  $25 < \text{CaCO}_3 \leq 50\%$  ; Very high:  $\text{CaCO}_3 > 50\%$ .



**Figure 7:** Influence of the total organic matter content on the presence of *Scedosporium* species in soil samples.

Very low:  $< 1\%$ ; Low: from 1 to  $< 2\%$ ; Medium: from 2 to  $< 3\%$ ; High: from 3 to  $< 5\%$ ; Very high:  $\leq 5\%$ .

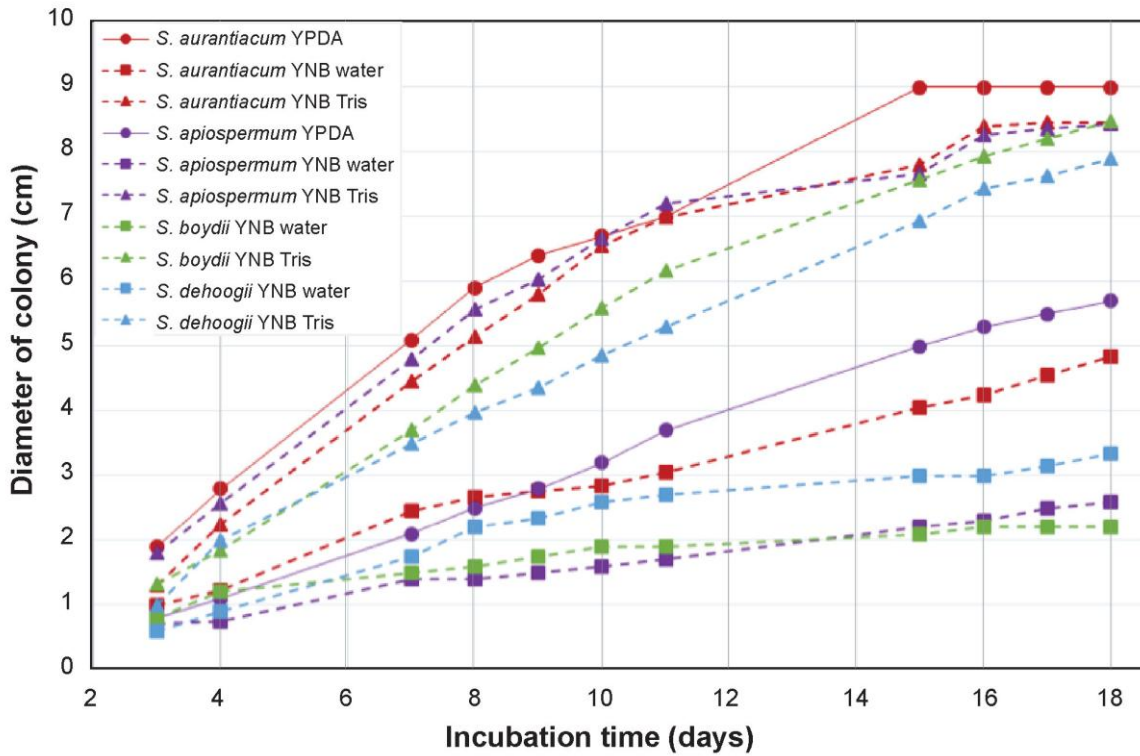
### *Growth of Scedosporium species on agar-based culture media*

To strengthen the influence of pH in the absence of *Scedosporium* species in soil samples from seashores and forests, growth of the four major species of the genus was investigated on agar-based YNB culture media with neutral or acid pH. The diameter of the colonies was measured every day from day 3 to 18 following inoculation. These experiments clearly demonstrated the influence of pH (Figure 8). Similar growth kinetics were observed for the four species on YNB agar plates pH 7.4 with colonies reaching between 7.9 and 8.5 at day 18. By contrast, although slight differences were observed between species cultivated on YNB agar plates with acid pH (5.4) with a colony diameter about twice larger at day 18 for *S. aurantiacum* compared to *S. boydii* and *S. apiospermum*, radial growth was markedly reduced for all species with a 50 to 75% reduction in the diameter of the colony at acid pH.

### *Scedosporium species distribution in soils from Morocco*

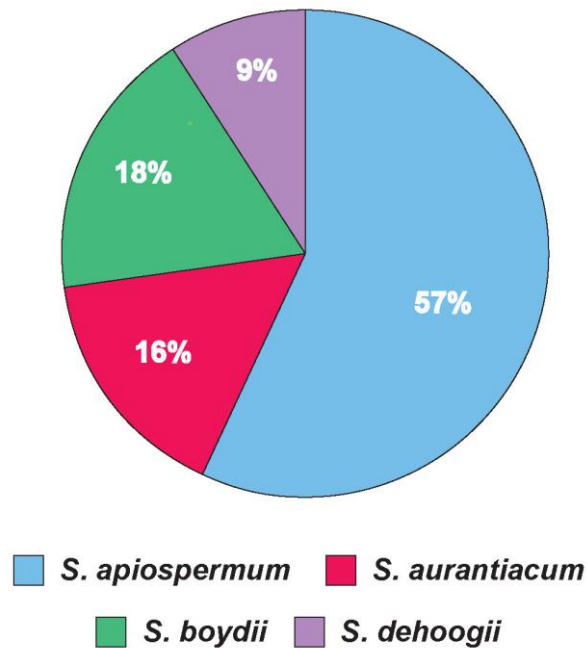
Among the 1084 *Scedosporium* colonies that were detected, 130 colonies representative of the different positive samples were successfully reisolated and preserved for precise species identification. As shown in Figure 9, *S. apiospermum* represented the most common *Scedosporium* species, representing 57% of these isolates. *Scedosporium boydii* and *S. aurantiacum* were almost equally represented. Conversely, no *S. minutisporum* isolates were detected and a few isolates were identified as *S. dehoogii*. Nevertheless, it is noteworthy that this last species represented the unique *Scedosporium* isolate detected from forest soils and was particularly common from samples from indoor environments, with 40% of these samples positive for this species (Supplemental Figure 2).





**Figure 8:** Influence of pH of the culture medium on radial growth of *Scedosporium* species in agar-based media.

YPDA: Yeast extract-peptone-dextrose-agar; YNB: Yeast nitrogen base.



**Figure 9:** Distribution of *Scedosporium* species among the isolates collected from soil samples from Rabat-Sale-Kenitra and Fez-Meknes regions, Morocco.

### Discussion

*Scedosporium* species are worldwide distributed filamentous fungi that are known in medical mycology on all continents. Regarding their ecology, they have been reported from a wide variety of environments, mainly nutrient-rich substrates such as manure of livestock, poultry or cattle, guano of bats and birds, agricultural soils, and poorly aerated nutrient-rich media like muds from ditches, ponds and WWTP (Rougeron *et al.*, 2017). Nevertheless, most of these reports do not take into account the taxonomic changes that occurred in the *Scedosporium* genus during the past decade. Here we conducted the first large-scale study about the ecology of *Scedosporium* species in Africa, by the analysis of a large number of soil samples representing various biomes in Northern Morocco. 48.5% of the samples were culture-positive for *Scedosporium* species. As expected the highest fungal densities were detected from highly polluted biomes, including WWTP and landfills, roadsides and polluted riverbanks, whereas all but one of the samples from protected areas such as seashores and forests were free of these fungi. These fungi are known to use some aliphatic and aromatic hydrocarbons as carbon and energy source (April *et al.*, 1998, 2000; Claußen and Schmidt, 1998, 1999) and all studies that have been conducted so far revealed the common occurrence of the fungi in human-impacted areas (Kaltseis *et al.*, 2009; Harun *et al.*, 2010; Rougeron *et al.*, 2014). For instance, these fungi were never detected from natural habitats, such as forests in Austria and sand dunes in The Netherlands (Kaltseis *et al.*, 2009), seashores and deciduous or evergreen forests in Western France (Rougeron *et al.*, 2014). Conversely, they were particularly common in industrial areas, followed by urban parks and agricultural areas (Kaltseis *et al.*, 2009). Likewise, Harun *et al.* (2010) in Sydney, Australia, showed a decreasing gradient in fungal density from the center of Sydney to rural areas around the city. The correlation with anthropogenic impact was also evidenced in Western France where *Scedosporium* species were mainly found from WWTP, agricultural areas, city parks and playgrounds and industrial areas (Rougeron *et al.*, 2014). Because of this, *Scedosporium* species have been proposed recently as long-term indicators of environmental pollution (Al-Yasiri *et al.*, 2017). Strikingly, only two reports have been published on the isolation of *Scedosporium* sp. from the environment in Morocco. The sand of two beaches from Casablanca in Northern Morocco was sampled and one *Scedosporium* isolate was recovered from each beach (Soussi Abdallaoui *et al.*, 2007). Likewise, a recent study was conducted to determine the diversity of entomopathogenic fungi in soil samples collected from Argane forests in Souss-Massa region (Hallouti *et al.*, 2017). *Scedosporium* spp. represented 3.4% of the entomopathogenic fungi that were recovered (Hallouti *et al.*, 2017). However, in both studies, fungi were identified at the genus level only, on the basis of morphological criteria, and the isolates were not preserved and therefore cannot be identified precisely.

The presence of *Scedosporium* species may also be influenced by some chemical parameters of the soils. For instance, it was shown to be associated with an increasing nitrogen concentration and a decreasing pH within a range of 6.1 – 7.5 (Kaltseis *et al.*, 2009). The same pH range was also found for *Scedosporium*-positive samples in Thailand

(Luplertlop *et al.*, 2016), whereas it was larger for positive samples in western France, from 4.9 to 8.5, with most of these samples showing a pH range from 6.1 to 7.9 (Rougeron *et al.*, 2014). In the present study, seven chemical parameters were determined in parallel to cultures, but none of these parameters considered individually was significantly associated with the presence or absence of *Scedosporium* species. However, a multiple linear regression analysis showed that the total nitrogen content of the soils was not the prominent parameter to explain the presence of the target fungi. *Scedosporium* species were principally detected in no salty soils, showing a pH comprised between 6.3 and 8.1 (mainly 6.9 to 7.5) and a weak to high calcium carbonate content, and moderately to very highly rich in organic matter. The influence of pH was also illustrated by comparison of the radial growth of these fungi in agar-based media with a neutral (7.4) or acid (5.4) pH. pH of soil samples from seashores was within the range 6.26 to 8.5 (mean: 7.8), which cannot explain why all these samples were free of *Scedosporium* species. Interestingly these samples were characterized by a class IV electrical conductivity (mean: 2.5 mS/cm), a very high calcium carbonate content (mean: 65.89%) and a very low organic matter content (0.74%) which seem to be detrimental to *Scedosporium* species. Likewise, all but one samples from forests were free of *Scedosporium* species, probably in relation with their high electrical conductivity (class III; mean: 1.45 mS/cm), since they showed a mean pH of 7.15, a weak calcium carbonate content (mean: 7.66%) and a very high organic matter content (mean: 11.37%). Further investigations should be conducted, including the determination of aromatic pollutants and bacteriological analysis since some of the bacterial species present in these biomes may inhibit the fungal growth.

Ten species are recognized today in the *Scedosporium* genus. Here, species identification was performed by MALDI-TOF / mass spectrometry according to Sitterlé *et al.* (2014). The corresponding database, however, was developed before the last taxonomic revision of the *Scedosporium* genus. The recently described species *S. cereisporum* is not taken into account in this database, but only two isolates are known today for this species, originating from the same sample from a WWTP in Western France (Crous *et al.*, 2016). In addition, *S. angustum* and *S. ellipsoideum* which are very close to *S. boydii*, as well as *S. fusoides* and *S. deficiens* which are very close to *S. apiospermum* and *S. dehoogii* respectively, were not considered in this database (Lackner *et al.*, 2014). Taking into account this limitation, soil samples from the Rabat-Sale-Kenitra and Fez-Meknes regions revealed a high prevalence of *S. apiospermum*, followed by *S. boydii* and *S. aurantiacum*, and a few isolates of *S. dehoogii*. Species distribution highly differed from that reported by Rougeron *et al.* (2014) in soils from Western France where *S. dehoogii* was the most abundant species (39.4% of the isolates), followed by *S. aurantiacum* (21.6%), *S. boydii* (19.7%) and *S. apiospermum* (18.9%) which were almost equally represented. Likewise, it was markedly different from that reported in the Sydney area by Harun *et al.* (2010) where almost all the isolates (95.8%) belonged to *S. aurantiacum*. Nevertheless, weather differences between summers and winters are limited in Australia, and one may speculate that the weather in Northern Morocco is less favorable to *S. aurantiacum* as noticed in similar studies conducted in Europe (Kaltseis *et al.*, 2009; Rougeron *et al.*, 2014). Interestingly, the frequency reported here for *S. dehoogii* is quite similar to that found for this fungus in Thailand (Luplertlop *et al.*, 2016). Nevertheless, it is

important to note that this fungus was particularly common in soil samples from the indoor environments, thus suggesting a regular exposition to this fungus although it has never been reported today as causing respiratory infections. As already noticed by Rougeron *et al.* (2017), the discrepancy between the common occurrence of this fungus in the indoor environment and its paucity in human respiratory infections needs to be investigated.

Together these results confirmed the impact of human activities on the ecology of *Scedosporium* species. Using a highly selective culture medium, the occurrence of these fungi in the environment in Morocco was shown to be relatively high. In addition, chemical analysis of the samples did not confirm the total nitrogen content of soil samples as a prominent parameter to explain the occurrence of *Scedosporium* species which seems to be determined by the electrical conductivity, pH and the total calcium carbonate and organic matter contents. Further studies should be conducted comparing the detection rate of *Scedosporium* species with the bacterial communities in soil samples, and including the determination of other chemical parameters of the soils, particularly the amount of aromatic pollutants, as well as some physical parameters which may influence aeration and water movement like texture, structure, consistence, bulk density and pore space.

## References

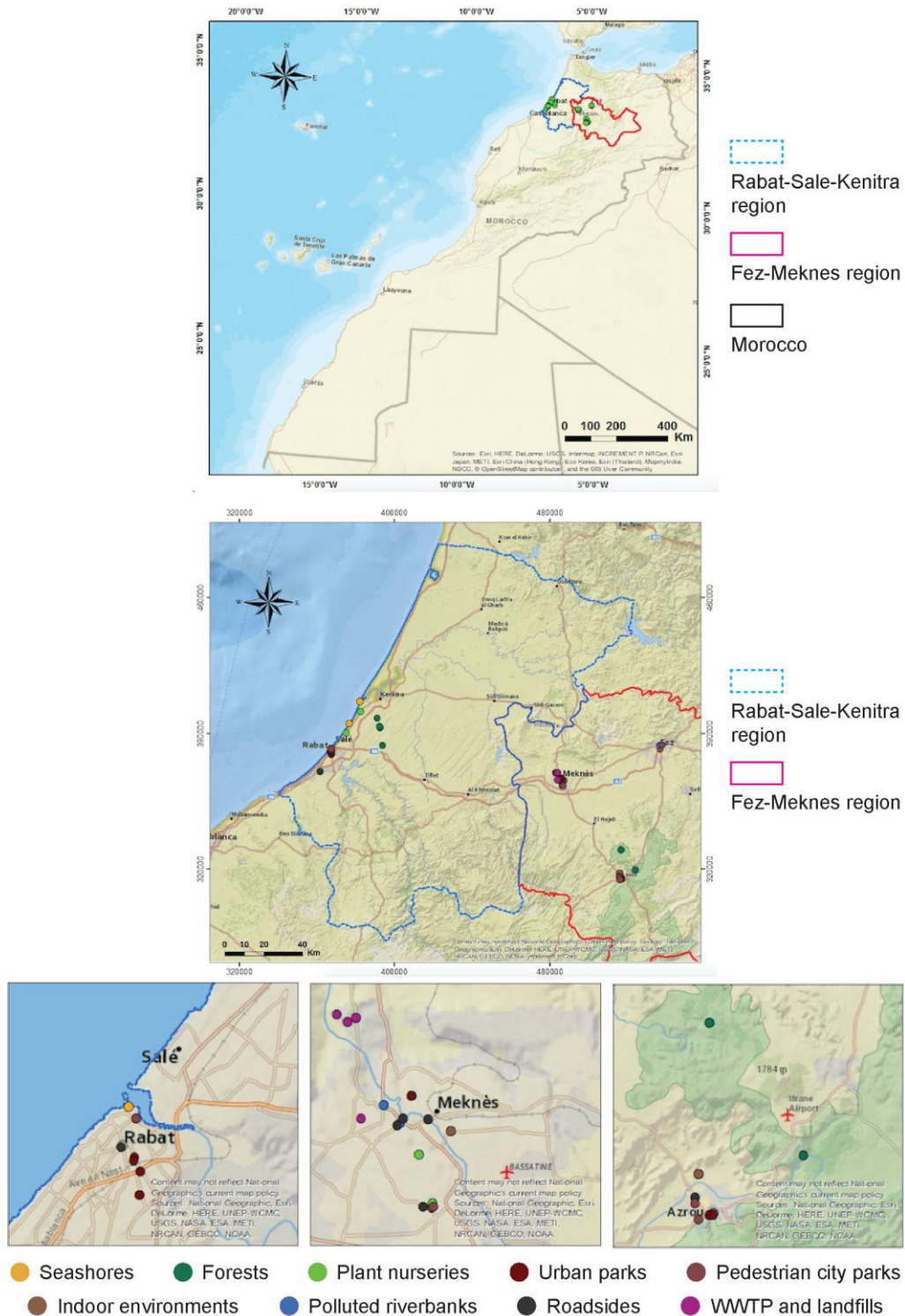
- Giraud S, Bouchara JP. *Scedosporium apiospermum* complex: diagnosis and species identification. *Curr Fungal Infect Rep* 2014, 8:211-219.
- Ramirez-Garcia A, Pellon A, Rementeria A, Buldain I, Barreto-Bergter E, Rollin-Pinheiro R, Vieira de Meirelles J, Xisto MI, Ranque S, Havlicek V, Patrick Vandeputte P, Le Govic Y, Bouchara JP, Giraud S, Chen S, Rainer J, Alastruey-Izquierdo A, Martin-Gomez MT, López-Soria LM, Peman J, Schwarz C, Anne Bernhardt A, Tintelnot K, Javier Capilla J, Martin-Vicente A, Cano-Lira J, Nagl M, Lackner M, Irinyi L, Meyer W, de Hoog S, Hernando FL. *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists. *Med Mycol* 2017.
- Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, 19:53-56.
- Blyth CC, Harun A, Middleton PG, Sleiman S, Lee O, Sorrell TC, Meyer W, Chen SC. Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. *J Clin Microbiol* 2010, 48:314-316.
- Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Reiffert SM. Detection of hyphomycetes in the upper respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Mycoses* 2011, 54:514-522.
- Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med Mycol* 2014, 52:179-186.

- Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, Albert F, Peter S, Würstl B, Wagner S, Klotz M, Becker A, Haase G, Laniado G, Kahl B, Suerbaum S, Seibold M, Tintelnot K. Prevalence of *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. *J Cyst Fibros* 2015, 14:237-241.
- Castiglioni B, Sutton DA, Rinaldi MG, Fung J, Kusne S. *Pseudallescheria boydii* (anamorph *Scedosporium apiospermum*). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. *Medicine* 2002, 81:333-348.
- Husain S, Muñoz P, Forrest G, Alexander BD, Somani J, Brennan K, Wagener MM, Singh N. 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.
- Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, Denis O, Estenne M, Nolard N, Jacobs F. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006, 25:603-607.
- Sahi H, Avery RK, Minai OA, Hall G, Mehta AC, Raina P, Budev M. *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2007, 26:350-356.
- Morio F, Horeau-Langlard D, Gay-Andrieu F, Talarmin JP, Haloun A, Treilhaud M, Despins P, Jossic F, Nourry L, Danner-Boucher I, Pattier S, Bouchara JP, Le Pape P, Miègeville M. Disseminated *Scedosporium/Pseudallescheria* infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2010, 48:1978-1982.
- Rougeron A, Giraud S, Alastruey-Izquierdo A, Cano-Lira J, Rainer J, Mouhajir A, Le Gal S, Nevez G, Meyer W, Bouchara JP. Ecology of *Scedosporium* species: present knowledge and future research. *Mycopathologia* 2017 Sep 19. doi: 10.1007/s11046-017-0200-2.
- 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.
- Gilgado F, Cano J, Gené 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.
- Gilgado F, Gené J, Cano J, Guarro J. Heterothallism in *Scedosporium apiospermum* and description of its teleomorph *Pseudallescheria apiosperma* sp. nov. *Med Mycol* 2010, 48:122-128.
- Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, Summerbell RC. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2008, 93:315-322.
- Pham T, Giraud S, Schuliar G, Rougeron A, Bouchara JP. Scedo-Select III: a new semi-selective culture medium for detection of the *Scedosporium apiospermum* species complex. *Med Mycol* 2015, 53:512-519.

- Rougeron A, Schuliar G, Leto J, Sitterlé E, Landry D, Bougnoux ME, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S. Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum* species complex. *Environ Microbiol* 2015, 17:1039-1048.
- Kaltseis J, Rainer J, De Hoog GS. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol* 2009, 47:398-405.
- Harun A, Gilgado F, Chen SC, Meyer W. 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* 2010, 48 Suppl 1:S70-S76.
- Luplertlop N, Pumeesat P, Muangkaew W, Wongsuk T, Alastruey-Izquierdo A. Environmental screening for the *Scedosporium apiospermum* species complex in public parks in Bangkok, Thailand. *PLoS One* 2016, 11(7):e0159869.
- Alvarez E, Sanhueza C. New record of *Scedosporium dehoogii* from Chile: Phylogeny and susceptibility profiles to classic and novel putative antifungal agents. *Rev Iberoam Micol* 2016, 33:224-229.
- Nweze EI, Okafor JI. *In vitro* activity of conventional antifungal agents against *Scedosporium apiospermum* isolates recovered from clinical and environmental samples in Nigeria. *Acta Microbiol Immunol Hung* 2010, 57:209-214.
- Soussi Abdallaoui M, Boutayeb H, Guessous-Idrissi N. Fungal flora from the sand of two beaches of Casablanca (Morocco): Analysis and epidemiological corollary. *J Mycol Méd* 2007, 17:58-62.
- Hallouti A, Zahidi A, Bouharroud R, El Mousadik A, Ait Ben Aoumar A, Boubaker H. Diversity of entomopathogenic fungi in Argane forest soil and their potential to manage Mediterranean fruit fly (*Ceratitis capitata*). *J Pharm Pharmacol* 2017, 5:746-754.
- Rayment GE, Higginson FR. Australian laboratory handbook of soil and water chemical methods. Australian Soil and Land Survey Handbooks, Inkata Press. Melbourne. 1992, vol 3.
- Walkley A, Black IA. An examination of the Degtjareff method for determining soil organic matter and a proposed modification of the chromic acid titration method. *Soil Sci* 1934, 37:29-38.
- Lamas F, Irigaray C, Oteo C, Chacon J. Selection of the most appropriate method to determine the carbonate content for engineering purposes with particular regard to marls. *Engineer Geol* 2005, 81:32-41.
- Olsen SR, Cole CV, Watanabe FS, Dean LA. Estimation of available phosphorus in soils by extraction with sodium bicarbonate. US Dep Agric Circ. 939. 1954.
- April TM, Abbott SP, Foght JM, Currah RS. Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae). *Can J Microbiol* 1998, 44:270-278.

- April TM, Foght JM, Currah RS. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can J Microbiol* 2000, 46:38-49.
- Claußen M, Schmidt S. Biodegradation of phenol and p-cresol by the hyphomycete *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol* 1998, 149:399-406.
- Claußen M, Schmidt S. Biodegradation of phenylbenzoate and some of its derivatives by *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol* 1999, 150:413-420.
- Al-Yasiri MH, Normand AC, Mauffrey JF, Ranque S. Anthropogenic impact on environmental filamentous fungi communities along the Mediterranean littoral. *Mycoses* 2017, 60:477-484.
- Sitterlé E, Giraud S, Leto J, Bouchara JP, Rougeron A, Morio F, Dauphin B, Angebault C, Quesne G, Beretti JL, Hassouni N, Nassif X, Bougnoux ME. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/Scedosporium* species. *Clin Microbiol Infect* 2014, 20:929-935.
- Crous PW, Wingfield MJ, Burgess TI, Hardy GE, Crane C, Barrett S, Cano-Lira JF, Le Roux JJ, Thangavel R, Guarro J, Stchigel AM, Martín MP, Alfredo DS, Barber PA, Barreto RW, Baseia IG, Cano-Canals J, Cheewangkoon R, Ferreira RJ, Gené J, Lechat C, Moreno G, Roets F, Shivas RG, Sousa JO, Tan YP, Wiederhold NP, Abell SE, Accioly T, Albizu JL, Alves JL, Antonioli ZI, Aplin N, Araújo J, Arzanlou M, Bezerra JD, Bouchara JP, Carlavilla JR, Castillo A, Castroagudín VL, Ceresini PC, Claridge GF, Coelho G, Coimbra VR, Costa LA, da Cunha KC, da Silva SS, Daniel R, de Beer ZW, Dueñas M, Edwards J, Enwistle P, Fiuza PO, Fournier J, García D, Gibertoni TB, Giraud S, Guevara-Suarez M, Gusmão LF, Haituk S, Heykoop M, Hirooka Y, Hofmann TA, Houbraken J, Hughes DP, Kautmanová I, Koppel O, Koukol O, Larsson E, Latha KP, Lee DH, Lisboa DO, Lisboa WS, López-Villalba Á, Maciel JL, Manimohan P, Manjón JL, Marinowitz S, Marney TS, Meijer M, Miller AN, Olariaga I, Paiva LM, Piepenbring M, Poveda-Molero JC, Raj KN, Raja HA, Rougeron A, Salcedo I, Samadi R, Santos TA, Scarlett K, Seifert KA, Shuttleworth LA, Silva GA, Silva M, Siqueira JP, Souza-Motta CM, Stephenson SL, Sutton DA, Tamakeaw N, Telleria MT, Valenzuela-Lopez N, Viljoen A, Visagie CM, Vizzini A, Wartchow F, Wingfield BD, Yurchenko E, Zamora JC, Groenewald JZ. Fungal Planet description sheets: 469-557. *Persoonia* 2016, 37:218-403.
- Lackner M, Hagen F, Meis JF, Gerrits van den Ende AH, Vu D, Robert V, Fritz J, Moussa TA, de Hoog GS. Susceptibility and diversity in the therapy-refractory genus *Scedosporium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 58:5877-5885.

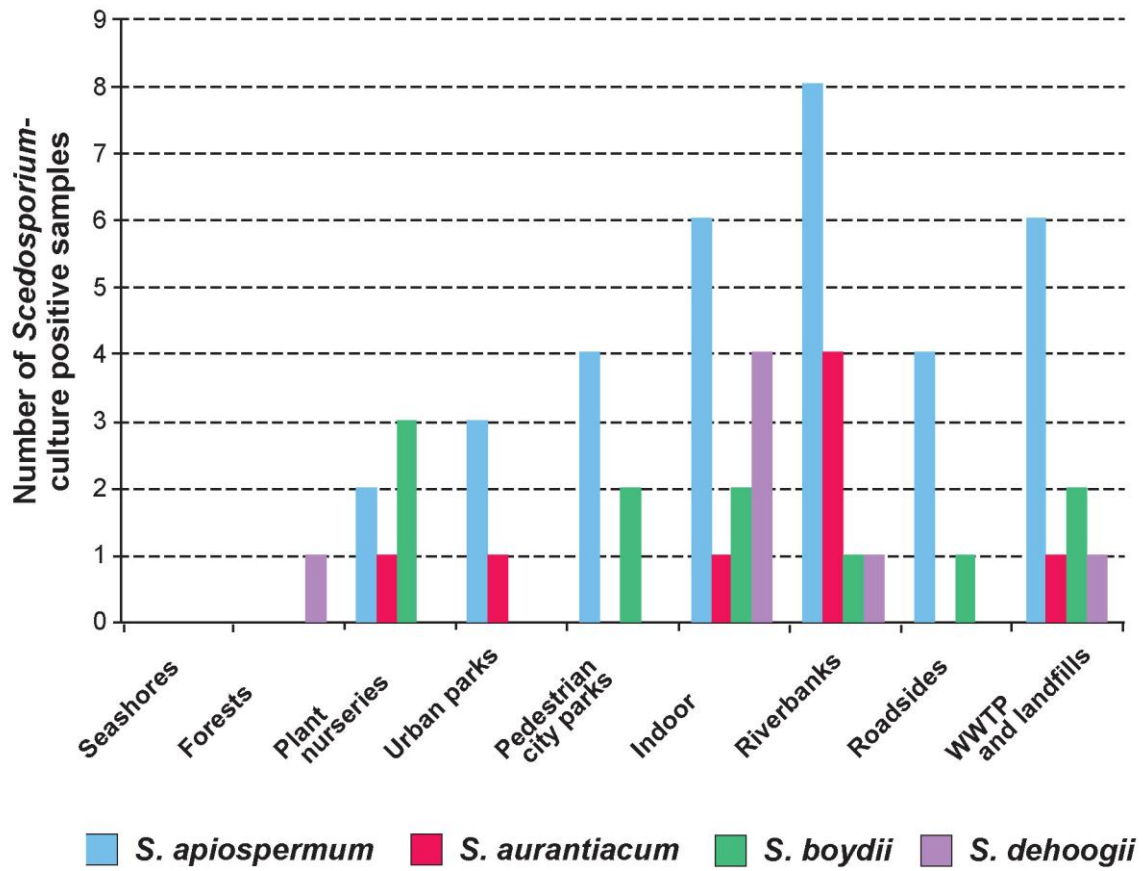
Supplemental material



**Supplemental Figure 1:** Location of the sampling sites in the Rabat-Sale-Kenitra and Fez-Meknes regions, Morocco.

WWTP: Wastewater treatment plant.





**Supplemental Figure 2:** Distribution of *Scedosporium* species among the isolates collected according to the type of soils.

WWTP: Wastewater treatment plant.

### Annexe

En dépit de l'utilisation d'un milieu de culture hautement sélectif développé au sein du laboratoire pour faciliter la détection des *Scedosporium* à partir des prélèvements environnementaux, d'autres genres ou espèces fongiques ont été détectés au cours de cette étude. L'ensemble de ces champignons est présenté en page suivante (Tableau 1), avec pour chaque type de sols analysés, le nombre de prélèvements positifs. Pour certains champignons, seul le genre est indiqué. L'isolement de tous les champignons détectés pour l'identification par spectrométrie de masse n'était pas techniquement envisageable, et cette étude était par ailleurs focalisée sur l'écologie des *Scedosporium*. De plus, cette liste ne peut être considérée comme présentant l'intégralité de la flore fongique des sols analysés ; l'objectif étant l'étude de l'écologie des *Scedosporium*, les prélèvements ont été ensemencés sur milieu Scedo-Select III et les incubations ont été réalisées à 37°C. Cette liste n'est donc qu'un reflet des champignons filamenteux thermotolérants présents, résistants au dichloran et au bénomyl, et capables d'utiliser le 4-hydroxybenzoate comme source de carbone et d'énergie.

Par ailleurs, 57 des 99 prélèvements étudiés ont été ensemencés en parallèle sur deux autres milieux sélectifs, DRBC-bénomyl (qui contient du dichloran, du bénomyl et du rose bengale) et Sce-Sel + développé par Rainer *et al.* (2008) et contenant du dichloran et du bénomyl également, mais se différenciant du Scedo-Select III par les sources de carbone et d'azote.

Les résultats obtenus confirment la sélectivité du milieu Scedo-Select III. La comparaison des résultats obtenus sur les trois milieux de culture (Tableau 2) montre un nombre de sites positifs pour le genre *Scedosporium* comparable entre Sce-Sel + et Scedo-Select III, mais plus élevé que celui observé sur gélose DRBC-bénomyl. Par contre, le nombre de sites positifs pour *Lomentospora prolificans* est plus élevé sur gélose Scedo-Select III, de même que le nombre total de colonies obtenues pour le genre *Scedosporium*. Par ailleurs, comme le montre le Tableau 1, 48 des 99 échantillons analysés sur Scedo-Select III ont révélé des *Scedosporium*, alors qu'en dépit de leur abondance dans l'environnement, des *Rhizopus* par exemple n'ont été détectés que pour 7 prélèvements et *Aspergillus fumigatus* pour 12 prélèvements. Les *Doratomyces* sont les Dématiés les plus fréquemment détectés sur ce milieu (35 prélèvements positifs) comme précédemment observé par Pham *et al.* (2014) et Rougeron *et al.* (2015). De même, comme précédemment observé, le genre *Mortierella* est le genre le plus fréquent parmi les Mucorales. Comme précédemment observé, ces deux genres sont encore plus fréquemment détectés sur gélose Sce-Sel + comparée à la gélose Scedo-Select III (Tableau 2).

Tableau 1 : Genres ou espèces fongiques détectés à partir des 99 prélèvements de terre analysés sur Scedo-Select III.

	Plages (n = 13)	Forêts (n = 10)	Pépinières (n = 12)	Aires de jeux (n = 10)	Parcs piétonniers (n = 10)	Intérieur (n = 12)	Rivières polluées (n = 10)	Bords de route (n = 10)	Stations d'épuration et décharges (n = 12)
<i>Scedosporium</i> sp.	/	1	7	3	5	9	9	5	9
<i>Lomentospora prolificans</i>	/	0	3	/	/	2	/	1	/
Mucorales									
<i>Cunninghamella</i> sp.	/	/	/	1	/	/	/	/	/
<i>Lichtheimia</i> sp.	/	1	1	/	2	3	5	1	4
<i>Mortierella</i> sp.	/	/	/	2	5	1	/	1	1
<i>Mucor</i> sp.	/	/	/	/	2	/	3	/	/
<i>Rhizopus</i> sp.	/	/	3	/	1	3	/	/	/
<i>Syncephalastrum</i> sp.	/	/	1	/	/	/	/	/	/
Mucorales non identifiables	/	1	/	1	/	5	1	/	1
Champignons filamenteux hyalins									
<i>Aspergillus fumigatus</i>	2	5	1	1	/	/	/	1	2
<i>Aspergillus nidulans</i>	/	/	/	/	1	/	/	/	/
<i>Aspergillus niger</i>	/	/	/	/	1	1	/	1	/
<i>Aspergillus versicolor</i>	/	2	2	1	1	1	/	1	4
<i>Aspergillus</i> sp.	/	2	4	1	/	2	6	4	4
<i>Paecilomyces</i> sp.	/	/	2	1	/	/	/	/	/
<i>Penicillium</i> sp.	/	/	4	2	1	1	5	3	3
<i>Scopulariopsis</i> sp.	/	/	3	/	2	7	3	1	3
Champignon filamenteux stérile	/	2	3	3	4	2	1	1	1
Dématiés									
<i>Alternaria</i> sp.	/	/	/	/	/	1	/	/	/
<i>Bipolaris</i> sp.	/	/	1	1	/	/	/	/	/
<i>Curvularia</i> sp.	/	/	/	1	1	/	2	1	/
<i>Doratomyces</i> sp.	/	1	4	5	6	9	6	1	3
<i>Drechslera</i> sp.	/	/	/	/	1	3	/	1	/
<i>Humicola</i> sp.	/	/	/	1	/	/	/	/	/
<i>Thermomyces stellatus</i>	/	1	/	1	/	/	/	/	/
<i>Ulocladium</i> sp.	/	/	/	/	/	/	/	1	/
Dématiés non identifiables	/	/	1	1	2	/	/	/	/

Les valeurs indiquées correspondent au nombre de sites positifs en culture.

## Travail expérimental : Étude 3

Tableau 2 : Genres ou espèces fongiques détectés à partir des 57 prélèvements de terre analysés parallèlement sur DRBC-bénomyl, Sce-Sel+ et Scedo-Select III.

	DRBC	Sce-Sel+	Scedo-Select III
<i>Scedosporium</i> sp.	6 (280)	17 (940)	<b>17 (1190)</b>
<i>Lomentospora prolificans</i>	2 (230)	1 (10)	<b>4 (2570)</b>
<b>Mucorales</b>			
<i>Cunninghamella</i> sp.	3	/	/
<i>Lichtheimia</i> sp.	11	12	5
<i>Mortierella</i> sp.	16	16	9
<i>Mucor</i> sp.	6	2	2
<i>Rhizomucor</i> sp.	2	2	/
<i>Rhizopus</i> sp.	9	6	5
<i>Syncephalastrum</i> sp.	1	2	1
Mucorales non identifiables	9	9	2
<b>Total</b>	<b>37</b>	<b>30</b>	<b>19</b>
<b>Aspergillus</b>			
<i>Aspergillus fumigatus</i>	15	17	11
<i>Aspergillus ochraceus</i>	1	/	/
<i>Aspergillus nidulans</i>	/	3	1
<i>Aspergillus niger</i>	/	6	1
<i>Aspergillus versicolor</i>	3	8	8
<i>Aspergillus</i> sp.	7	18	8
<b>Total</b>	<b>22</b>	<b>33</b>	<b>23</b>
<b>Autres champignons filamenteux hyalins</b>			
<i>Chrysosporium</i> sp.	1	/	/
<i>Fusarium</i> sp.	2	4	/
<i>Paecilomyces</i> sp.	1	/	2
<i>Penicillium</i> sp.	5	10	8
<i>Scopulariopsis</i> sp.	5	11	9
Champignon filamenteux stérile	14	30	13
<b>Total</b>	<b>21</b>	<b>35</b>	<b>24</b>
<b>Dématiés</b>			
<i>Alternaria</i> sp.	1	/	1
<i>Bipolaris</i> sp.	/	1	2
<i>Curvularia</i> sp.	1	1	2
<i>Doratomyces</i> sp.	4	24	13
<i>Drechslera</i> sp.	/	3	1
<i>Humicola</i> sp.	/	/	1
<i>Stemphilium</i> sp.	2	1	/
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1	1	/
<i>Thermomyces stellatus</i>	/	2	2
<i>Ulocladium</i> sp.	/	1	/
Dématiés non identifiables	2	6	4
<b>Total</b>	<b>7</b>	<b>31</b>	<b>19</b>

Les valeurs indiquées correspondent au nombre de sites positifs en culture. Entre parenthèses est indiqué le nombre total d'Unités Formant Colonies obtenues sur l'ensemble des boîtes de Pétri pour les 57 prélèvements étudiés en parallèle sur les trois milieux de culture.

# **DISCUSSION**

Dans la mucoviscidose le tableau clinique est dominé par les atteintes de l'appareil respiratoire, l'hyperviscosité du mucus s'accompagnant d'une paralysie des cils vibratiles qui tapissent l'épithélium des voies aériennes avec pour conséquence l'absence d'élimination des particules inhalées (poussières et microorganismes). L'épaississement du mucus bronchique crée par ailleurs un changement dans le microenvironnement des voies respiratoires qui favorise le développement des microorganismes et la colonisation des voies respiratoires avec pour conséquence une réaction inflammatoire. La réaction inflammatoire a pour objectif la défense de l'organisme contre les agents infectieux et la préservation de l'intégrité des tissus, Néanmoins, contrairement à ce observé habituellement, les mécanismes de réponse pro-inflammatoire activés dans le contexte de la mucoviscidose semblent agir d'une manière excessive et déséquilibrée. Cette inflammation, intense et persistante, conduit à des dommages structurels permanents des voies aériennes (bronchectasie) et à une altération progressive de la fonction pulmonaire qui aboutit à l'insuffisance respiratoire et au décès du patient.

Les infections dans la mucoviscidose sont déterminées principalement par les bactéries. Néanmoins, l'augmentation de l'espérance de vie des patients s'est accompagnée d'une augmentation de la fréquence des infections respiratoires d'origine virale ou fongique. En effet, les lésions tissulaires épithéliales causées par les infections bactériennes et la réaction inflammatoire qui s'en suit, facilitent l'adhésion des spores fongiques inhalées. Une importante diversité fongique a été décrite dans les sécrétions respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Parmi les champignons rencontrés on trouve les espèces du genre *Scedosporium*, qui se situent au deuxième rang parmi les champignons filamenteux isolés dans ce contexte, après *Aspergillus fumigatus*, et les espèces du complexe *Rasamsonia argillacea* récemment décrit et dont la prévalence chez les patients atteints de mucoviscidose est certainement sous-estimée du fait de ses caractéristiques morphologiques qui sont très proches de celles des *Penicillium* et *Paecilomyces*, à l'origine d'erreurs d'identification.

Des révisions taxonomiques importantes ont été réalisées récemment sur le genre *Scedosporium* comme sur le complexe *R. argillacea*. Le genre *Scedosporium* comprend aujourd'hui 10 espèces, dont cinq sont particulièrement importantes en mycologie médicale : *S. aurantiacum*, *S. boydii*, *S. dehoogii*, *S. minutisporum* et *S. apiospermum sensu stricto* (Ramirez-Garcia *et al.*, 2017). D'autre part, les travaux de Houbraken *et al.* (2012) ont montré que certaines espèces initialement classées dans le genre *Geosmithia* forment un clade distinct au sein des Trichocomaceae. Ces espèces ont donc été réassignées à un nouveau genre appelé *Rasamsonia* qui comprend diverses espèces dont quatre sont morphologiquement très voisines formant le complexe *R. argillacea* : *R. argillacea sensu stricto*, *R. eburnea*, *R. piperina* et *R. aegroticola*.

Comme nous l'avons exposé auparavant, les espèces du genre *S. apiospermum* peuvent être à l'origine d'une large variété d'infections, allant des atteintes cutanées et sous-cutanées (mycétomes) à des infections disséminées chez les patients sévèrement immunodéprimés. Ces champignons peuvent aussi causer des infections respiratoires et être à l'origine de mycoses broncho-pulmonaires allergiques (MBPA) qui surviennent principalement dans le contexte de la mucoviscidose. D'autre part, Le nombre des cas rapporté impliquant les espèces du complexe *R. argillacea* ne cesse d'augmenter chez les patients atteints de mucoviscidose comme dans le contexte de la granulomatose septique familiale (CGD pour *chronic granulomatous disease*) ou de greffe de moelle osseuse où des cas de pneumonies et des infections disséminées ont été rapportés. Néanmoins, peu de données sont disponibles concernant l'épidémiologie de la colonisation des voies respiratoires par ces champignons.

Face à l'émergence de ces pathogènes dans le contexte de la mucoviscidose, l'étude de ces champignons est importante non seulement pour comprendre le rôle qu'ils peuvent jouer dans le processus de la réaction inflammatoire, mais aussi du fait de leur capacité à disséminer en cas de déficit immunitaire et de leur résistance à de nombreux antifongiques. La sensibilité aux antifongiques peut d'ailleurs varier selon l'espèce en cause au sein du genre *Scedosporium* ou du complexe *R. argillacea*. Dès lors, la prévention est d'une grande importance, et le typage moléculaire d'un grand nombre d'isolats cliniques ou environnementaux est nécessaire pour mieux connaître l'épidémiologie des infections qu'ils engendrent dans la mucoviscidose, et notamment pour identifier les sources de contamination. Compte tenu des très grandes similitudes morphologiques entre les espèces du complexe *R. argillacea*, comme dans le genre *Scedosporium*, l'identification actuelle de ces champignons est basée sur le séquençage d'au moins un locus, et leur génotypage n'est possible que pour le genre *Scedosporium*, par séquençage d'un grand nombre de loci, une méthode longue et onéreuse. Dans ce contexte, nous nous sommes proposé d'évaluer l'intérêt de l'amplification des séquences répétitives de l'ADN (rep-PCR) pour la différenciation spécifique et infraspécifique dans le genre *Scedosporium* et le complexe *R. argillacea*.

L'amplification des séquences répétitives de l'ADN (rep-PCR) est une technique d'analyse d'empreintes génétiques qui consiste en l'amplification de séquences répétitives non codantes dispersées dans le génome. Les produits d'amplification sont en suite séparés par électrophorèse et les profils électrophorétiques obtenus sont comparés pour étudier le polymorphisme entre les isolats. DiversiLab<sup>®</sup> (bioMérieux) est un kit commercial conçu pour standardiser et simplifier l'usage de la rep-PCR. Il existe plusieurs kits spécifiques aux différents microorganismes étudiés. Dans cette étude, deux kits ont été utilisés, DiversiLab<sup>®</sup> *Fungal* kit dont les amorces sont conçues pour l'étude de l'ensemble des champignons filamenteux, et le DiversiLab<sup>®</sup> *Aspergillus* kit dont les amorces ont été conçues pour l'étude du genre *Aspergillus*.

Nous avons dans un premier temps appliqué la rep-PCR à l'analyse rétrospective d'un panel de 63 d'isolats multiples ou séquentiels appartenant à ce qui était considéré jusqu'à l'an dernier comme le complexe *S. apiospermum*, provenant d'expectorations de patients atteints de mucoviscidose. Ces isolats avaient précédemment été étudiés par Defontaine *et al.* (2002) par amplification aléatoire de fragments d'ADN polymorphes (RAPD pour *rapid amplification of polymorphic DNA*), seule technique disponible à l'époque pour le typage des *Scedosporium*. Nous avons ainsi démontré que la rep-PCR peut être utilisée pour la différenciation des souches au sein de ce complexe d'espèces. Ces résultats sont en accord avec les résultats auparavant obtenus par rep-PCR pour les deux espèces majeures de ce complexe, *S. apiospermum sensu stricto* et *S. boydii* (Steinmann *et al.*, 2010). Les données de rep-PCR obtenues avec le système semi-automatisé DiversiLab ont été comparées aux génotypes précédemment obtenus par RAPD (Defontaine *et al.*, 2002) et aux séquences types MLST (*multi locus sequence typing*) déterminées dans ce travail. En parallèle, les isolats ont été identifiés précisément par séquençage partiel du gène codant la beta-tubuline (*TUB*). Les données de rep-PCR étaient cohérentes avec l'identification des espèces, *S. boydii* était l'espèce la plus représentée avec 36 isolats suivi de *Scedosporium apiospermum sensu stricto* avec 21 isolats et *S. aurantiacum* (4 isolats). Concernant la différenciation infraspécifique, une très bonne concordance a été observée entre les résultats de rep-PCR et ceux de RAPD ou de MLST. D'autre par, le dendrogramme généré à partir des résultats de rep-PCR avec le kit *Fungal* a révélé des regroupements très proches des ceux rapportés par Gilgado *et al.* (2005). Par contre lorsque le kit *Aspergillus* été utilisé le regroupement était un peu différent, avec les deux isolats de *P. ellipsoidea* clairement séparés des isolats de *S. boydii*. Ces résultats apportent un nouvel argument expérimental relançant le débat sur le statut de *P. ellipsoidea* (Lackner *et al.*, 2014a). Depuis la réalisation de ces expériences, des études taxonomiques complémentaires ont été réalisées. Une nouvelle espèce a été décrite l'an dernier dans le genre *Scedosporium* (Crous *et al.*, 2016), *S. cereisporum*. De plus, le statut de certaines espèces qui était discuté comme *P. ellipsoidea*, est aujourd'hui confirmé. Le genre *Scedosporium* comprend donc aujourd'hui dix espèces, à savoir : *S. aurantiacum*, *S. cereisporum*, *S. desertorum*, *S. dehoogii*, *S. minutisporum*, et les membres du complexe *S. apiospermum* qui se limite aujourd'hui à *S. angustum*, *S. apiospermum sensu stricto*, *S. boydii*, *S. ellipsoideum* et *S. fusoideum* (Ramirez-Garcia *et al.*, 2017).

Plusieurs méthodes moléculaires permettant la détection rapide des espèces du complexe *S. apiospermum*, et parfois l'identification directe des espèces, ont été décrites telles que le PCR quantitative en temps réel, la PCR-RLB (PCR-based reverse line blot) et la technique LAMP (loop-mediated isotherm amplification). Cependant, ces méthodes ne sont pas commercialisées et sont donc difficiles à mettre en œuvre en routine. Une détection rapide, précise et simple des espèces peut être réalisée, à partir des isolats obtenus en cultures, par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (Matrix-Assisted LASER Desorption Ionization Time-Of-Flight), mais actuellement, une base des données spécifique pour les espèces du complexe *S. apiospermum* n'est disponible que sur la plateforme Andromas (Del Chierico *et al.*, 2012; Sitterlé *et al.*, 2014). En outre, le génotypage des



isolats est nécessaire pour différencier entre un portage transitoire de génotypes toujours différents et donc sans conséquence clinique et une véritable colonisation chronique des voies respiratoires qui peut participer à la réaction inflammatoire et à la dégradation progressive de la fonction pulmonaire comme cela été démontré pour *C. albicans* ou *A. fumigatus* (Chotirmall *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2010; Fillaux *et al.*, 2012), Pourtant aucune des méthodes citées ci-dessus ne permet la différenciation infraspécifique des souches.

D'après les résultats précédemment obtenus avec la RAPD pour notre panel d'isolats, Il a été suggéré que les patients atteints de mucoviscidose sont généralement colonisés par un seul génotype conservé au fil du temps malgré le traitement antifongique (Defontaine *et al.*, 2002). Dans notre thèse, nous avons confirmé avec la rep-PCR et la MLST que, quelle que soit l'espèce dans le genre *Scedosporium*, chaque patient est colonisé par un génotype unique (différent d'un patient à l'autre). Par exemple, il a été montré par RAPD que le patient P1 était colonisé par un génotype largement dominant associé à deux autres génotypes très proches du génotype dominant (trouvés uniquement de manière transitoire) (Defontaine *et al.*, 2002). Curieusement, une seul profil électrophorétique rep-PCR et une seule séquence type MLST ont été obtenus pour tous les isolats du patient P1. En revanche, deux génotypes RAPD distincts ont été retrouvés de manière successive chez le patient P8, avec d'abord un génotype retrouvé de manière transitoire et donc incapable de s'établir dans les voies respiratoires, suivi d'une colonisation chronique des voies respiratoires par un autre génotype (Defontaine *et al.*, 2002). Une évolution similaire a été révélée ici par rep-PCR et MLST. En outre, Zouhair *et al.* (2013) ont documenté un cas pour lequel un patient a été colonisé de manière chronique par deux espèces différentes, *S. boydii* et *S. aurantiacum* avec dans un premier temps une colonisation chronique par une des deux espèces, puis apparition de la seconde espèce qui s'installe elle aussi de manière chronique dans les voies respiratoires et élimine la première. Dans notre étude, une seule espèce a été identifiée pour chaque patient.

La capacité des espèces du genre *Scedosporium* à coloniser de manière chronique les voies respiratoire est aujourd'hui établie. À la suite des révisions taxonomiques dans le genre *Scedosporium*, Zouhair *et al.* (2013) ont démontré par RAPD que, comme *S. apiospermum sensu stricto* et *S. boydii* (Defontaine *et al.*, 2002), *S. aurantiacum* et *S. minutisporum* sont capables de coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients. La RAPD a aussi permis de caractériser des isolats de *Scedosporium* lors d'infections invasives mortelles. Dans ces publications, le typage moléculaire des isolats cliniques a révélé, qu'en dépit du traitement par voriconazole, un génotype unique était identifié tout au long du suivi, confirmant les résultats *in vitro* montrant la faible activité de ce triazolé sur ces champignons (Borghetti *et al.*, 2010; Morio *et al.*, 2010). Dans notre cas, pour les patients P1, P3, P4, P5, P6 et P7, un seul génotype a été retrouvé pour chaque patient avant l'initiation du traitement, génotype qui se maintenait durant le traitement antifongique. Les patients P2 et P9 n'ont pas reçu de traitement. Le patient P8 est le seul pour lequel on retrouve deux génotypes distincts ; néanmoins, il n'y a aucun lien entre les dates d'isolement de chaque génotype et les périodes de traitement antifongique.

D'autres techniques moléculaires ont prouvé leur capacité de différenciation infraspécifique et révélé la grande diversité génétique des *Scedosporium* dans le contexte de la mucoviscidose. La technique AFLP (*amplified fragment length polymorphism*) a été utilisée pour le typage d'isolats cliniques et les résultats obtenus ont confirmé que les voies respiratoires des patients peuvent être colonisées de manière chronique par un génotype unique (Lackner *et al.*, 2011). De même, la MLST a été appliquée à l'analyse de 68 isolats cliniques de *S. apiospermum sensu stricto* et de 47 isolats de *S. boydii*. Les résultats ont révélé une grande diversité au sein de ces deux espèces, avec 8 séquences types détectées pour *S. boydii* (pour 14 patients) et 32 séquences types pour *S. apiospermum* (pour 34 patients). En outre, l'étude a confirmé le caractère chronique des colonisations respiratoires (Bernhardt *et al.*, 2013).

Le génotypage est également essentiel à des fins épidémiologiques. Les espèces du genre *Scedosporium* sont des champignons filamenteux ubiquistes dans l'environnement, mais l'origine de la contamination des patients reste encore inconnue. Une étude environnementale réalisée en Autriche et aux Pays-Bas a montré que *S. apiospermum* est l'espèce la plus fréquente dans les zones industrielles, les parcs urbains et les aires de jeux et les zones agricoles (Kaltseis *et al.*, 2009). En revanche, *S. boydii* s'est révélé comme la principale espèce colonisant les voies respiratoires d'une cohorte de patients français atteints de mucoviscidose (Zouhair *et al.*, 2013). La rep-PCR qui permet à la fois l'identification des espèces et le génotypage devrait faciliter la comparaison des isolats cliniques et environnementaux, et donc l'identification de l'origine de la contamination des patients.

Dans un deuxième temps, nous avons appliqué la rep-PCR à l'analyse rétrospective d'un panel d'isolats multiples ou séquentiels appartenant au complexe *R. argillacea* et provenant d'expectorations prélevées chez des patients atteints de mucoviscidose et d'un patient atteint de granulomatose septique familiale (CGD).

Steinmann *et al.* (2014) ont développé une technique de PCR en temps réel pour la détection et l'identification directe des espèces du complexe *R. argillacea*. Néanmoins, cette technique reste confidentielle, les amorces utilisées n'ayant pas été publiées et n'étant pas commercialisées à l'heure actuelle. L'identification précise de ces espèces nécessite donc le séquençage de certaines régions discriminantes du génome, comme les régions ITS 1 et 2 de l'ADN ribosomique ou une partie du gène de la bêta-tubuline (Houbraken *et al.*, 2012; Houbraken *et al.*, 2013). Dans notre étude, l'analyse par rep-PCR d'un nombre important d'isolats cliniques du complexe *R. argillacea* a donné des regroupements cohérents avec les résultats de séquençage. Sur les 116 isolats étudiés, 112 provenaient de patients atteints de mucoviscidose, *R. aegroticola* était l'espèce dominante avec 80 isolats, suivie de *R. argillacea sensu stricto* avec 27 isolats et *R. piperina* avec seulement 5 isolats. Aucun isolat n'a été identifié comme *R. eburnea*. Les quatre isolats provenant d'un patient atteint de CGD ont été identifiés comme *R. argillacea sensu stricto*. A l'exception d'un seul patient qui présentait deux espèces distinctes (*R. argillacea* en 2006, puis *R. aegroticola* en 2009), tous

les patients étaient colonisés / infectés par une seule espèce bien que plusieurs isolats (jusqu'à 18) aient été étudiés pour certains patients.

Comme nous l'avons indiqué ci-dessus, seulement trois espèces du complexe *R. argillacea* ont été isolées dans le contexte de la mucoviscidose, à savoir: *R. argillacea sensu stricto*, *R. aegroticola* et *R. piperina* (Houbraken *et al.*, 2012). Contrairement aux résultats obtenus par Houbraken *et al.* (2012) également pour des patients atteints de mucoviscidose, *R. aegroticola* était plus fréquent que *R. argillacea sensu stricto*. Les quatre isolats provenant d'un patient atteint de CGD ont été identifiés comme *R. argillacea sensu stricto*, et d'autres isolats issus de ce contexte clinique devraient être étudiés pour déterminer s'il existe ou non une association avec la granulomatose septique familiale. À signaler que dans tous les cas d'infections à *Rasamsonia* rapportés depuis 2000 chez les patients atteints de CGD, toutes les espèces du complexe de *R. argillacea* ont été trouvées sauf *R. eburnea* (De Ravin *et al.*, 2011; Machouart *et al.*, 2011; Ishiwada *et al.*, 2015). Toutes ces espèces sont très proches génétiquement et, par conséquent, il est probable qu'elles partagent plusieurs caractéristiques similaires dans leur physiologie et leur biologie. Les séquences complètes des génomes de deux espèces du genre *Rasamsonia* (*R. emersonii* et *R. byssochlamydoïdes*) sont maintenant disponibles, et des études consistant à séquencer le génome de plusieurs souches de chaque espèce de ce complexe devraient être menées pour réaliser une analyse bioinformatique comparative avec pour objectif d'identifier des gènes communs aux trois espèces pathogènes, mais absents chez *R. eburnea*, et donc potentiellement impliqués dans la pathogénicité. Une approche similaire est actuellement en cours pour les espèces du genre *Scedosporium* puisque, à l'exception de *S. dehoogii*, toutes les espèces initialement comprises dans le complexe *S. apiospermum* ont été décrites dans le contexte de la mucoviscidose (Zouhair *et al.*, 2013) alors que *S. dehoogii* est largement représenté dans l'environnement (Kaltseis *et al.*, 2009; Rougeron *et al.*, 2015).

Parmi les 116 isolats de *Rasamsonia* ici étudiés, 29 génotypes ont été identifiés. En général, la plupart des génotypes étaient spécifiques d'un patient, bien que certains génotypes ont été détectés chez différents patients. Six des 15 génotypes de *R. aegroticola* ont été partagés par des patients non reliés d'un point de vue épidémiologique, vivant notamment dans des zones géographiques différentes et suivis dans des centres de ressources et de compétences de la mucoviscidose différents. Trois génotypes ont été détectés chez 5 ou 6 patients, ce qui suggère une plus grande aptitude de ces génotypes à la colonisation des voies respiratoires. Il faut cependant envisager le fait que ces génotypes soient plus fréquents dans l'environnement. Néanmoins, peu d'informations sont disponibles concernant l'écologie de ces champignons, sur la distribution des espèces dans l'environnement ainsi que sur les sources de contamination des patients. En outre, deux patients (frère et sœur) suivis dans l'hôpital de Paris-Necker ont été colonisés par le même génotype suggérant une transmission d'un patient à l'autre ou une contamination par la même source environnementale. La transmission entre frères et sœurs atteints de mucoviscidose ou l'infection par une souche d'une source environnementale commune a été démontrée pour de nombreux agents pathogènes bactériens, y compris *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter*

*xylosoxidans* (Renders *et al.*, 1997; Krzewinski *et al.*, 2001; Abdul Wahab *et al.*, 2014; Harik *et al.*, 2015). Ce phénomène a également été signalé pour certains agents pathogènes fongiques comme les espèces du genre *Candida* (Muthig *et al.*, 2010) ou *Pneumocystis jirovecii* (Respaldiza *et al.*, 2005). Des enquêtes devraient être menées afin de clarifier l'écologie de ces champignons et d'identifier des niches potentielles dans l'environnement domestique des patients.

Les données de cette étude présentent la première description de la présence de différentes espèces de *Rasamsonia* dans les voies respiratoires d'un patient atteint de mucoviscidose avec une évolution progressive des génotypes de ces espèces. Certains génotypes de *R. argillacea* et *R. aegroticola* ont été trouvés dans des échantillons séquentiels pendant des mois ou des années, ce qui suggère que ces espèces peuvent coloniser de manière chronique les voies respiratoire des patients atteints de mucoviscidose. La capacité de *R. piperina* à coloniser de manière chronique les voies respiratoires n'a pas été démontrée ici car il n'y avait qu'un nombre limité de patients positifs pour cette espèce et très peu d'isolats disponibles pour chaque patient positif.

La pathogénicité des espèces du complexe de *R. argillacea* chez les patients atteints de CGD a été clairement établie, la plupart des patients souffraient de pneumonie avec parfois invasion des tissus adjacents (De Ravin *et al.*, 2011; Machouart *et al.*, 2011; Ishiwada *et al.*, 2015). En revanche, dans le contexte de la mucoviscidose les données sur la pathogénicité de ces espèces sont limitées. Un seul cas d'infection respiratoire causée par un *Rasamsonia* a été signalé. Chez ce patient, la présence de *R. argillacea* a été associée à des symptômes semblables à ceux de l'asthme (avec diminution marquée du volume expiratoire maximal par seconde, VEMS) (Marguet *et al.*, 2012). Néanmoins, la mise en évidence de l'aptitude de certains génotypes à coloniser de manière chronique les voies aériennes inférieures des patients atteints de mucoviscidose prouve la persistance de ces champignons habituellement saprophytes dans les voies respiratoires, et suggère leur contribution à la réaction inflammatoire qui conduit à une détérioration progressive de la fonction pulmonaire.

D'un point de vue pratique, les résultats obtenus pour ces deux complexes de champignons émergents dans la mucoviscidose confirment l'intérêt de la technique de rep-PCR comme une méthode rapide et reproductible pour la différenciation spécifique et infraspécifique des champignons pathogènes. La rep-PCR avait déjà été utilisée avec succès pour le génotypage de différents champignons, y compris des levures du genre *Candida* ou des champignons filamenteux du genre *Aspergillus* ou du groupe des dermatophytes, ainsi que pour certains champignons dimorphiques (Healy *et al.*, 2004; Pounder *et al.*, 2005; Pounder *et al.*, 2006; Wise *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2008). Dans notre cas, l'analyse de nos panels d'isolats par rep-PCR a montré des regroupements cohérents avec les résultats de l'identification moléculaire, démontrant ainsi que cette méthode convient également à l'identification des espèces dans le genre *Scedosporium* et le complexe *R. argillacea*.

D'un point de vue théorique, nous avons confirmé, pour les espèces du complexe *S. apiospermum*, et démontré pour les espèces du complexe *R. argillacea*, la capacité de ces champignons à coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose. Ceci suggère une contribution possible de ces pathogènes à la réaction inflammatoire et à la dégradation progressive de la fonction pulmonaire comme cela a été démontré pour la colonisation à long terme par *C. albicans* ou *A. fumigatus* (Chotirmall *et al.*, 2010; Amin *et al.*, 2010; Fillaux *et al.*, 2012). Par ailleurs, le dépistage du caractère chronique de la colonisation par ces champignons revêt également un intérêt majeur si une transplantation pulmonaire ou cœur-poumons devient inévitable, compte tenu de l'aptitude de ces champignons à disséminer en cas d'immunodépression et de leur multi-résistance aux antifongiques classiques. Les cas de scédosporiose disséminée après transplantation sont nombreux, et Symoens *et al.* (2006) ont clairement démontré que l'infection invasive était causée par la souche colonisant les voies respiratoires avant la transplantation. De plus, il a été rapporté récemment une infection disséminée fatale à *R. aegroticola* à la suite d'une transplantation pulmonaire chez une patiente atteinte de mucoviscidose et l'analyse rétrospective des isolats pré-greffe (initialement considérés comme des *Paecilomyces*) et post-greffe par séquençage des régions ITS (internal transcribed spacer) 1 et 2 des ADN ribosomiaux et par RAPD a montré qu'il s'agissait en fait de la même espèce et plus précisément du même génotype (Hong *et al.*, 2017).

D'un point de vue technique, l'utilisation du système DiversiLab<sup>®</sup> garantit la standardisation et la reproductibilité de la rep-PCR. En effet, les réactifs utilisés font partie de kits commerciaux et l'ensemble du système est semi-automatisé. De plus, l'interprétation des résultats est assistée par un logiciel. Tous ces avantages rendent envisageables la création d'un banque de profils électrophorétiques pour l'identification et le génotypage d'espèces fongiques et la comparaison inter-laboratoires à des fins épidémiologiques.

La RAPD est une technique largement utilisée pour le typage moléculaire des champignons d'intérêt médical (Harun *et al.*, 2009). Dans le contexte de la mucoviscidose, cette technique a été utilisée avec succès pour la caractérisation de la colonisation des voies respiratoire par différents champignons filamenteux comme *Aspergillus* (Verweij *et al.*, 1996; Cimon *et al.*, 2001), *Lomentospora prolificans* (Ruiz-Diez *et al.*, 1997; San Milan *et al.*, 1997), *Exophiala dermatitidis* (Pacneu *et al.*, 2012) et *Scedosporium* (Zouhair *et al.*, 2001; Defontaine *et al.*, 2002; Morio *et al.*, 2010; Borghi *et al.*, 2010; Zouhair *et al.*, 2013). Toutes ces études ont fait de la RAPD une méthode de référence en l'absence de données sur le génome de l'agent causal. On reproche à cette technique son manque de reproductibilité inter-laboratoires interdisant toute étude multicentrique, et cette technique a été supplantée avec le développement des techniques moléculaires et la disponibilité des génomes de nombreux pathogènes par d'autres méthodes de type AFLP, analyse de marqueurs microsatellites ou la MLST qui est cependant plus lourde et plus onéreuse. Dans notre étude, les résultats obtenus par rep-PCR pour les *Scedosporium* ont été en accord étroit avec ceux obtenus par RAPD, mais aussi par MLST, ce qui peut faire de la rep-PCR une alternative intéressante pour le génotypage, plus reproductible que la RAPD, et plus facile à réaliser que la MLST.

La colonisation des voies respiratoires par les *Scedosporium* est vraisemblablement due à l'inhalation de spores aéroportées. Néanmoins, la fréquence de ces champignons dans la mucoviscidose est remarquable par rapport à la rareté de leur isolement dans l'air. Un tel écart soulève des questions sur l'origine de la contamination des patients et sur les mécanismes de sélection de ces champignons parmi la grande diversité des moisissures présentes dans l'environnement. Dans ce contexte nous nous sommes proposés d'étudier l'écologie et la distribution des espèces du genre *Scedosporium* dans différents biotopes au Maroc. Une meilleure connaissance de l'habitat naturel et des réservoirs potentiels de ces champignons dans l'environnement permettrait peut être de proposer des mesures visant à prévenir la contamination des patients.

Les espèces du genre *Scedosporium* ont déjà été isolées dans différents biotopes en Europe, notamment en Autriche et aux Pays-Bas (Kaltseis *et al.*, 2009) et en France (Rougeron *et al.*, 2015), mais aussi en Australie (Harun *et al.*, 2010) et en Thaïlande (Luplertlop *et al.*, 2016). Ici nous reportons la première investigation écologique systématique pour ces champignons au Maroc et, à notre connaissance, sur le continent africain. Les espèces du genre *Scedosporium* sont ubiquistes dans les sols au Maroc, mais elles semblent plus abondantes dans les zones impactées par les activités humaines. En effet, le pourcentage de sites positifs pour la présence de *Scedosporium* varie entre 90% et 30% dans les différentes zones impactées par les activités humaines, alors que seul un prélèvement en forêt était positif et aucun des 13 prélèvements réalisés sur les plages ne s'est avéré positif pour ces champignons. De plus, les charges fongiques les plus élevées ont été observées dans des prélèvements collectés dans une station d'épuration et une décharge publique, avec une densité moyenne de 318 UFC/g de sol, suivis des prélèvements réalisés en bordure de routes avec une densité de 183 UFC/g et les berges de rivières polluées (125 UFC/g).

Kaltseis *et al.* (2009) ont été les premiers à illustrer que les *Scedosporium* ne peuvent être isolés que dans les environnements impactés par les activités humaines. Dans cette étude, sur 136 échantillons de sol analysés, la plus grande concentration en ces champignons a été retrouvée dans les zones industrielles, suivis des jardins et aires de jeux en milieu urbain, et des zones agricoles. Par contre, aucun isolat de *Scedosporium* n'a été obtenu dans les habitats naturels comme les forêts et les pages (Kaltseis *et al.*, 2009). Par la suite, trois autres études ont confirmé cette tendance des *Scedosporium* à préférer les zones fortement polluées. A Sydney, en Australie, la plus grande concentration en *Scedosporium* a été observée dans les zones fortement anthropisées (dans un cercle de 3 km autour du centre de Sydney) (Harun *et al.*, 2010). En France, 119 échantillons de terre ont été collectés dans 11 différents biotopes. Les densités les plus importantes en *Scedosporium* ont été retrouvées dans les zones agricoles avec 92% des échantillons positifs pour ces champignons, et 40% à 60% des prélèvements positifs pour les berges de rivières, les parcs et aires de jeux en milieu urbain, les zones industrielles et les boues de stations d'épuration. A l'inverse, tous les échantillons prélevés en forêts étaient négatifs en culture pour les *Scedosporium* (Rougeron *et al.*, 2015). Enfin, la présence des *Scedosporium* a été investiguée dans 10 jardins publics à Bangkok en Thaïlande. Les *Scedosporium* ont été

isolés dans 41 des 68 échantillons de sol analysés et un seul des 15 échantillons d'eau (Luplertlop *et al.*, 2016). Dans toutes ces études, les environnements impactés par les activités humaines semblent être les principaux réservoirs pour ces champignons saprophytes. Ces sites sont caractérisés généralement par une construction abondante, des espaces verts limités, une agrégation du sol avec des surfaces adjacentes et de la poussière, et des émissions liées au trafic (caoutchouc, sels de voirie et hydrocarbures) (Kaltseis *et al.*, 2009). Comme nous l'avons exposé auparavant, les champignons du genre *Scedosporium* sont capables d'assimiler différents composés organiques comme les hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques (April *et al.*, 1998; Claußen et Schmidt, 1998; April *et al.*, 1999; Claußen et Schmidt, 1999; Auria *et al.*, 2000; García-Peña *et al.*, 2001; Janda-Ulfig *et al.*, 2008).

A la suite des révisions taxonomiques dans le genre *Scedosporium*, plusieurs études environnementales ont été réalisées pour définir les caractéristiques écologiques des différentes espèces *Scedosporium*. Ces études ont montré des variations dans l'abondance des espèces du genre *Scedosporium* selon les pays et selon les environnements. Dans notre cas, la mise en culture des échantillons de terre a été réalisée sur le milieu semi-sélectif Scedo-Selcet III, un milieu de culture conçu pour prévenir ou limiter le développement des champignons à croissance rapide et extensive en faveur des *Scedosporium* dont la croissance est relativement lente (Pham *et al.*, 2015). Nous avons pu collecter 130 isolats de *Scedosporium* et leur identification à l'espèce a été réalisée par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF. *Scedosporium apiospermum sensu stricto* était l'espèce la plus abondante avec 74 isolats (57%), suivie par *S. boydii* avec 23 isolats, *S. aurantiacum* avec 21 isolats et *S. dehoogii* 12 isolats, alors qu'aucun isolat de *S. minutisporum* n'a été identifié. En plus, *S. apiospermum* a été isolé dans tous les biotopes impactés par les activités humaines avec un pourcentage de sites positifs qui varie entre 17% dans les pépinières et 80% dans les berges de rivières polluées. Le milieu Scedo-Selct III a été aussi utilisé pour une étude comparable en France, montrant cette fois *S. dehoogii* comme l'espèce dominante, suivi de loin par *S. boydii*, *S. apiospermum* et *S. aurantiacum* qui ont été retrouvés dans des proportions voisines (Rougeron *et al.*, 2015). Récemment, Luplertlop *et al.* (2016) ont aussi utilisé le milieu Scedo-Select III pour étudier la distribution des différentes espèces *Scedosporium* dans des échantillons de sol et des eaux dans les jardins publics à Bangkok. Dans cette étude, *S. apiospermum* était l'espèce dominante (73%). Curieusement, aucune souche *S. boydii* n'a été identifiée et seulement 6 souches de *S. aurantiacum* et 5 souches de *S. dehoogii* ont été retrouvées.

En Autriche et aux Pays-Bas, c'est le milieu SceSel+ développé par Rainer *et al.* (2007a) qui a été utilisé pour étudier la distribution des différentes espèces de *Scedosporium* dans l'environnement. *Scedosporium apiospermum* était l'espèce prédominante suivie de *S. dehoogii*. *Scedosporium boydii* et *S. aurantiacum* étaient beaucoup moins représentés faiblement trouvés et *S. minutisporum* seulement dans les zones industrielles (5,8%) (Kaltseis *et al.*, 2009). En Australie la distribution des espèces est très différente, la mise en culture des échantillons de terre sur milieu DRBC-bénomyl a montré une large prédominance de l'espèce *S. aurantiacum* avec plus de 95% des isolats du genre

*Scedosporium*, alors que *S. boydii* et *S. dehoogii* n'étaient que rarement détectés. Ces différences dans la répartition des espèces du genre *Scedosporium* pourraient être liées à des facteurs climatiques. En Australie, l'échantillonnage a été effectué en décembre et répété en juillet, mais aucune variation saisonnière n'a été observée (Harun *et al.*, 2010). Néanmoins, les écarts de température et pluviosité entre les saisons sont peu prononcés dans ce pays. La situation pourrait être différente dans d'autres pays, en particulier en Amérique du Nord et en Europe, où des différences plus marquées peuvent être observées dans les conditions météorologiques entre l'été et l'hiver. Le milieu de culture utilisé doit aussi être considéré. En effet, bien qu'il ait été démontré que les milieux de culture semi-sélectifs utilisés dans ces études permettaient la croissance des différentes espèces du genre *Scedosporium*, on ne peut ignorer la variabilité entre les espèces, voire entre les souches d'une même espèce, dans leur capacité à utiliser les sources de carbone disponibles dans ces milieux de culture, ce qui pourrait expliquer la faible occurrence observée pour certaines espèces (Rougeron *et al.*, 2017).

Les espèces du genre *Scedosporium* sont présentes aussi bien à l'extérieur qu'à l'intérieur des habitations. Dans notre étude, nous avons recherché la présence de ces champignons dans 12 échantillons de terre collectés dans des plantes en pots et des jardins intérieurs. Neuf de ces prélèvements (75%) étaient positifs pour *Scedosporium*. Ceci est en accord avec des études antérieures ayant rapporté l'abondance des *Scedosporium* dans la terre de plantes en pot dans un hôpital au Canada (Summerbell *et al.*, 1989) ou au domicile de patients atteints de mucoviscidose et colonisés par *S. apiospermum* (Sidot *et al.*, 2007). Ces résultats confirment que les plantes en pot constituent un réservoir majeur pour ces champignons pathogènes et, par conséquent, leur présence au domicile des patients constitue un facteur de risque de contamination et donc d'infection respiratoire.

Peu des données sont disponibles concernant les caractéristiques physico-chimiques du sol pouvant influencer sur la prolifération des *Scedosporium*. Kaltseis *et al.* (2009) ont montré que l'abondance des *Scedosporium* était corrélée avec la diminution du pH dans une gamme de 7,5 à 6,1, une gamme de pH également retrouvée pour les échantillons positifs provenant de Bangkok. En France, les espèces du genre *Scedosporium* ont été rencontrées dans une gamme de pH plus large, de 4,9 à 8,5 (Rougeron *et al.*, 2015). Dans notre étude le pH des sites positifs varie de 5,8 à 8,5, bien que la plupart des échantillons positifs (45/48) aient des pH compris entre 6,1 et 7,9.

Outre le pH, nous avons déterminé six autres paramètres physico-chimiques pour les échantillons de sols (la conductivité électrique, la teneur en azote total, la teneur en matières organiques, la dureté calcique et les taux de potassium et de phosphore). Aucune différence significative n'a été observée dans la présence ou l'absence des *Scedosporium* en fonction de ces paramètres. Néanmoins, nous avons constaté que ces champignons préfèrent des faibles concentrations salines, 56% des sites positifs avaient des valeurs de conductivité très basses, entre 0,09 mS/cm et 0,5 mS/cm (sols non salés). Il semble aussi que les *Scedosporium* aient une affinité pour les sols riches en matière organique : près de 90% des sites positifs avaient des teneurs en matière organique comprises entre 2,02% et 17,5%.



Notre étude apporte donc des données complémentaires de nature à permettre une meilleure compréhension de l'écologie de ces champignons. D'autres facteurs qui favorisent vraisemblablement la croissance des membres de ces espèces n'ont pas encore été étudiés en détail, comme la hausse des températures et l'abaissement de la pression partielle en oxygène du fait de l'imperméabilisation des sols et de l'agrégation des particules de sol en milieu urbain ou encore la pollution des sols par les hydrocarbures (Kaltseis *et al.*, 2009).

# **CONCLUSION ET PERSPECTIVES**

Dans la mucoviscidose, une flore fongique importante a été décrite à partir des expectorations des patients, au sein de laquelle le genre *Scedosporium* et le complexe d'espèces *Rasamsonia argillacea* occupent une place particulière compte tenu de leur émergence dans ce contexte clinique (en lien au moins en partie avec l'amélioration des connaissances et des méthodes de détection), de leur résistance ou très faible sensibilité naturelle à la plupart des antifongiques systémiques actuels, et de leur rareté dans l'environnement qui contraste avec leur fréquence dans la mucoviscidose. Ces champignons peuvent déterminer des infections disséminées en cas de déficit immunitaire. Ces infections graves et souvent mortelles surviennent essentiellement après une transplantation pulmonaire ou cœur-poumons, qui constitue encore aujourd'hui le traitement ultime des patients atteints de mucoviscidose. Dès lors, il apparaît primordial de développer des méthodes rapides de détection et d'identification de ces pathogènes, mais aussi de typage pour mieux comprendre l'épidémiologie de ces infections/colonisations, et ainsi contribuer à l'amélioration de la prise en charge des patients atteints de mucoviscidose.

Notre thèse s'inscrit dans ce cadre général puisque que nous avons dans un premier temps évalué l'intérêt de l'utilisation du système semi-automatisé DiversiLab<sup>®</sup>, basé sur l'analyse des séquences répétitives d'ADN (rep-PCR), pour l'identification et le génotypage des espèces constituant jusqu'à ces derniers mois le complexe *S. apiospermum*. Dans un deuxième temps, nous avons étendu cette étude au complexe d'espèces *R. argillacea*.

Les résultats confirment l'efficacité de la rep-PCR aussi bien pour la différenciation des espèces du complexe *S. apiospermum* que pour le génotypage des isolats dans ce complexe. Les profils génotypiques obtenus pour des isolats multiples (issus d'un même prélèvement) ou séquentiels (issus de prélèvements successifs chez un même patient) montrent que les champignons étudiés sont tous capables de coloniser de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, confirmant ainsi pour les espèces du genre *Scedosporium* des données précédemment obtenues par RAPD. En outre, les résultats de génotypage rep-PCR sont similaires à ceux obtenus avec la RAPD (random amplified polymorphic DNA) et la MLST (multi locus sequence typing). La rep-PCR est beaucoup plus reproductible que la RAPD et présente un pouvoir discriminant comparable à celui de la MLST, avec la même possibilité de comparaison inter-laboratoires des résultats. Par ailleurs, comparée à la MLST, la rep-PCR offre l'avantage d'une semi-automatisation de l'analyse. Ceci peut faire de la rep-PCR une alternative intéressante à la RAPD, mais aussi à la MLST qui est devenue la méthode de référence pour le génotypage des isolats de *Scedosporium*.

La technique rep-PCR a également montré son efficacité pour l'identification des espèces et la différenciation des génotypes au sein du complexe *R. argillacea*. Cette première étude sur l'épidémiologie moléculaire de la colonisation des voies respiratoires par les espèces du complexe *R. argillacea*, a démontré la capacité d'au moins deux espèces de ce complexe (*R. aegroticola* et *R. argillacea sensu stricto*) à engendrer une colonisation chronique au cours de la mucoviscidose. Cependant, le nombre de génotypes pourrait être sous-estimé par rep-PCR, et d'autres systèmes de typage, comme la MLST ou l'analyse de marqueurs microsatellites, doivent être développés pour confirmer nos résultats.

Les espèces pathogènes du genre *Scedosporium* ou *Rasamsonia* sont décrites comme résistantes à de nombreux antifongiques. Néanmoins, pour évaluer l'influence des traitements antifongiques sur le profil de colonisation, il conviendrait de réaliser une étude longitudinale prenant en compte les données cliniques des patients, le génotype des isolats ainsi que leur profil de sensibilité aux antifongiques.

L'utilisation de la rep-PCR avec le système Diversilab<sup>®</sup> permet la standardisation de l'analyse, garantissant ainsi une très bonne reproductibilité. Cependant ce système est relativement onéreux et le coût de l'analyse est élevé, en raison de la nécessité de passer un grand nombre d'échantillons à la fois. Ces inconvénients rendent difficile l'utilisation de cette technologie dans un laboratoire de routine.

Compte tenu de l'incidence croissante des espèces du genre *Scedosporium* dans les infections humaines, et des conséquences graves d'une colonisation des voies respiratoires par ces champignons, des mesures préventives visant à réduire le risque d'exposition aux spores de ces champignons, et donc d'infestation, revêtent un intérêt majeur. Ceci nécessite une meilleure connaissance de l'habitat de ces champignons et des sources de contamination des patients. Dans ce contexte, nous nous sommes également penché dans cette thèse sur l'écologie de ces champignons, et nous nous sommes proposé de caractériser l'habitat naturel des *Scedosporium*.

La présente étude rapporte la première investigation écologique systématique des espèces du genre *Scedosporium* au Maroc et, à notre connaissance, sur le continent africain. Au Maroc, ces champignons sont ubiquistes dans le sol, et leur fréquence est étroitement associée au degré d'anthropisation. Nos résultats confirment aussi que les plantes d'intérieurs (terre des plantes en pot et des jardins intérieurs) sont un réservoir important pour les espèces *Scedosporium* et constitue donc une source potentielle de contamination des patients atteints de mucoviscidose. La distribution des espèces au sein du genre *Scedosporium* est un peu différente de celle observée en France avec une proportion de *S. dehoogii* un peu plus faible au Maroc. Néanmoins, cette espèce inconnue dans la mucoviscidose, reste relativement fréquente dans l'environnement dans notre étude. Des études de génomique comparative devraient être conduites pour préciser ce qui différencie *S. dehoogii* des espèces pathogènes et l'empêche de s'installer de manière durable dans les voies respiratoires. Par ailleurs, de nombreux isolats environnementaux sont aujourd'hui disponibles en provenance de France, d'Autriche, d'Australie, de Thaïlande et maintenant du Maroc, autorisant la réalisation d'études de génétique des populations.

Enfin, nos résultats montrent que ces champignons saprophytes préfèrent des sols de pH neutre, riches en matières organiques et pauvres en sels. Il serait intéressant d'élargir ce travail en étudiant d'autres facteurs qui peuvent favoriser la croissance des espèces du genre *Scedosporium*, comme la température du sol, les pressions partielles en oxygène et en dioxyde de carbone, la présence des hydrocarbures ou encore de certains oligoéléments comme le fer.

# **BIBLIOGRAPHIE**

- Abdul Wahab A, Taj-Aldeen SJ, Hagen F, Diophode S, Saadoon A, Meis JF, Klaassen CH. Genotypic diversity of *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis siblings in Qatar using AFLP fingerprinting. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2014, 33 : 265–271.
- Aho R, Hirn J. A survey of fungi and some indicator bacteria in chlorinated water of indoor public swimming pools. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg [B]* 1981, 173 : 242–249.
- Ajello L. Soil as natural reservoir for human pathogenic fungi. *Science* 1956, 123 : 876–879.
- Ajello L. The isolation of *Allescheria boydii* Shear, an etiologic agent of mycetomas, from soil. *Am J Trop Med Hyg* 1952, 1 : 227–38.
- Ajello L, Kuttin ES, Beemer AM, Kaplan W, Padhye A. 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* 1977, 26 : 140–147.
- Ajello L, Zeidberg LD. Isolation of *Histoplasma capsulatum* and *Allescheria boydii* from soil. *Science* 1951, 113 : 662–663.
- Alteras I, Evolveanu R. First isolation of *Allescheria boydii* from Romanian soil. *Sabouraudia* 1969, 7 : 135–137.
- 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.
- Andersen D. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: A clinical and pathologic study. *Am J Dis Child* 1938, 56 : 344–399.
- April TM, Abbott SP, Foght JM, Currah RS. Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae). *Can J Microbiol* 1998, 44 : 270–278.
- April TM, Foght JM, Currah RS. Hydrocarbon-degrading filamentous fungi isolated from flare pit soils in northern and western Canada. *Can J Microbiol* 1999, 46 : 38–49.
- Araujo R, Cabral JP, Rodrigues AG. Air filtration systems and restrictive access conditions improve indoor air quality in clinical units: *Penicillium* as a general indicator of hospital indoor fungal levels. *Am J Infect Control* 2008, 36 : 129–134.
- Auria R, Frere G, Morales M, Acuña ME, Revah S. Influence of mixing and water addition on the removal rate of toluene vapors in a biofilter. *Biotechnol Bioeng* 2000, 68 : 448–455.
- Babu AG, Kim SW, Yadhav DR, Adhikari M, Kim C, Lee HB, Lee YS. A new record of *Pseudallescheria boydii* isolated from crop field soil in Korea. *Mycobiology* 2014, 42 : 397–400.
- Bain JM, Tavanti A, Davidson AD, Jacobsen MD, Shaw D, Gow NAR, Odds FC. Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol* 2007, 45 : 1469–1477.
- Bakerspigel A, Schaus D. Petriellidosis (pseudallescheriasis) in southwestern Ontario, Canada. *Sabouraudia J Med Vet Mycol* 1984, 22 : 247–249.
- Barker AP, Horan, JL, Slechta ES, Alexander BD, Hanson KE. Complexities associated with the molecular and proteomic identification of *Paecilomyces* species in the clinical mycology laboratory. *Med Mycol* 2014, 52 : 537–545.

- Barton RC, Borman AM, Johnson EM, Houbraken J, Hobson RP, Denton M, Conway SP, Brownlee KG, Peckham D, Lee TWR. Isolation of the fungus *Geosmithia argillacea* in sputum of people with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2010, 48 : 2615–2617.
- Beguín H, Nolard N. Mould biodiversity in homes I. Air and surface analysis of 130 dwellings. *Aerobiologia* 1994, 10 : 157–166.
- Bellis G, Cazes MH, Parant A, Gaimard M, Travers C, Roux EL, Ravilly S, Rault G. Cystic fibrosis mortality trends in France. *J Cyst Fibros* 2007, 6 : 179–186.
- Bellis G, Dehillote C, Lemonnier L. Registre français de la mucoviscidose – Bilan des données 2015. Vaincre la Mucoviscidose et Institut national d'études démographiques (Ined), Paris. 2016.
- Bell RG. The development in beef cattle manure of *Petriedlidium boydii* (Shear) Malloch, a potential pathogen for man and cattle. *Can J Microbiol* 1976, 22 : 552–556.
- Bendiak GN, Ratjen F. The approach to *Pseudomonas aeruginosa* in cystic fibrosis. *Semin Respir Crit Care Med* 2009, 30 : 587–595.
- Bernhardt A, Sedlacek L, Wagner S, Schwarz C, Würstl B, Tintelnot K. Multilocus sequence typing of *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* isolates from cystic fibrosis patients. *J Cyst Fibros* 2013, 12 : 592–598.
- Bertrand S, Bouchara JP, Venier MC, Richomme P, Duval O, Larcher G. N<sup>α</sup>-methyl coprogen B, a potential marker of the airway colonization by *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* 2010, 48 : S98–S107.
- Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen SCA. 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.
- Borghi E, Iatta R, Manca A, Montagna MT, Morace G. Chronic airway colonization by *Scedosporium apiospermum* with a fatal outcome in a patient with cystic fibrosis. *Med Mycol* 2010, 48 : S108–S113.
- Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrère J, Favennec L, Ranque S, Gangneux JP, Horré R, Bouchara JP. 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* 2010, 48 : S88–S97.
- Bouchara JP, Hsieh HY, Croquefer S, Barton R, Marchais V, Pihet M, Chang TC. Development of an oligonucleotide array for direct detection of fungi in sputum samples from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2009, 47 : 142–152.
- Brandsberg JW, Weeks RJ, Hill WB, Piggott WR. A study of fungi found in association with *Histoplasma capsulatum*: three bird roosts in S.E. Missouri, U.S.A. *Mycopathol Mycol Appl* 1969, 38 : 71–81.
- Bush A, Bilton D, Hodson M. Hodson and Geddes' cystic fibrosis, fourth edition. CRC Press. 2015. 699 pp.
- Buzina W, Feierl G, Haas D, Reinthaler FF, Holl A, Kleinert R, Reichenpfader B, Roll P, Marth E. 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* 2006, 44 : 473–477.

- Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: pathogenesis and therapy. *J Cyst Fibros* 2015, 14 : 419–430.
- Cariani L, Biffi A, Guarneri D, Girelli D, Teri A, D'Accico M, Beltrami B, Arghittu M, Torresani E, Colombo C. Colonization by *Rasamsonia argillacea* in cystic fibrosis patients: A two-year retrospective study. *J Cyst Fibros* 2015, 14 Suppl 1 : S71.
- Castiglioni B, Sutton DA, Rinaldi MG, Fung J, Kusne S. *Pseudallescheria boydii* (anamorph *Scedosporium apiospermum*). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2002, 81 : 333–348.
- Cazin J, McCulloch WF, Braun JL. Isolation of *Histoplasma capsulatum*, *Allescheria boydii* and *Microsporium gypseum* from Iowa soil in an attempt to determine the probable point source of a case of histoplasmosis. *J Iowa State Med Soc* 1962, 52 : 348–351.
- Ceylan E, Ozkutuk A, Ergor G, Yucesoy M, Itil O, Caymaz S, Cimrin A. Fungi and indoor conditions in asthma patients. *J Asthma* 2006, 43 : 789–794.
- Chabasse D, Bouchara JP, Chazalette JP, Carrère J, Giniès JL, de Gentile L, Cimon B. Mucoviscidose et colonisation fongique à *Scedosporium apiospermum*. A propos de trois observations. *J Mycol Méd* 1991, 1 : 152–155.
- Chen M, Zeng J, De Hoog GS, Stielow B, Gerrits Van Den Ende AHG, Liao W, Lackner M. The “species complex” issue in clinically relevant fungi: a case study in *Scedosporium apiospermum*. *Fungal Biol* 2016, 120 : 137–146.
- Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum *Candida albicans* presages FEV<sub>1</sub> decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. *Chest* 2010, 138:1186–1195.
- Cimon B, Carrère J, Chazalette JP, Giniès JL, Six P, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP. Fungal colonization and immune response to fungi in cystic fibrosis. *J Mycol Méd* 1995, 5 : 211–216.
- Cimon B, Carrère J, Chazalette JP, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP. Chronic airway colonization by *Penicillium emersonii* in a patient with cystic fibrosis. *Med Mycol* 1999, 37 : 291–293.
- Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000, 19 : 53–56.
- Cimon B, Symoens F, Zouhair R, Chabasse D, Nolard N, Defontaine A, Bouchara JP. Molecular epidemiology of airway colonisation by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. *J Med Microbiol* 2001, 50 : 367–374.
- Claußen M, Schmidt S. Biodegradation of phenol and *p*-cresol by the hyphomycete *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol* 1998, 149 : 399–406.
- Claußen M, Schmidt S. Biodegradation of phenylbenzoate and some of its derivatives by *Scedosporium apiospermum*. *Res Microbiol* 1999, 150 : 413–420.
- Claustres M, Guittard C, Bozon D, Chevalier F, Verlingue C, Ferec C, Girodon E, Cazeneuve C, Bienvenu T, Lalau G, Dumur V, Feldmann D, Bieth E, Blayau M, Clavel C, Creveaux I, Malinge MC, Monnier N, Malzac P, Mittre H, Chomel JC, Bonnefont JP, Iron A, Chery M, Georges MD. Spectrum of CFTR mutations in cystic fibrosis and in congenital absence of the vas deferens in France. *Hum Mutat* 2000, 16 : 143–156.



- Coburn B, Wang PW, Diaz Caballero J, Clark ST, Brahma V, Donaldson S, Zhang Y, Surendra A, Gong Y, Tullis DE, Yau YCW, Waters VJ, Hwang DM, Guttman DS. Lung microbiota across age and disease stage in cystic fibrosis. *Sci Rep* 2015, 5 : 10241.
- Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. *Science* 1992, 256 : 774–779.
- Cooke WB, Kabler P. Isolation of potentially pathogenic fungi from polluted water and sewage. *Public Health Rep* 1955, 70 : 689–694.
- Cooney DG, Emerson R. Thermophilic fungi - an account for their biology, activities and classification. Freeman WH and Co, San Francisco. 1964. 188 pp.
- Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, Rinaldi MG, Shea YR, Zaoutis T, Kottlil S, Walsh TJ. Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin Microbiol Rev* 2008, 21 : 157–197.
- Corzo-León DE, Satlin MJ, Soave R, Shore TB, Schuetz AN, Jacobs SE, Walsh TJ. Epidemiology and outcomes of invasive fungal infections in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients in the era of antifungal prophylaxis: a single-centre study with focus on emerging pathogens. *Mycoses* 2015, 58 : 325–336.
- Crous PW, Wingfield MJ, Burgess TI, Hardy GESTJ, Crane C, Barrett S, Cano-Lira JF, Le Roux JJ, Thangavel R, Guarro J, Stchigel AM, Martín MP, Alfredo DS, Barber PA, Barreto RW, Baseia IG, Cano-Canals J, Cheewangkoon R, Ferreira RJ, Gené J, Lechat C, Moreno G, Roets F, Shivas RG, Sousa JO, Tan YP, Wiederhold NP, Abell SE, Accioly T, Albizu JL, Alves JL, Antonioli ZI, Aplin N, Araújo J, Arzanlou M, Bezerra JDP, Bouchara JP, Carlavilla JR, Castillo A, Castroagudín VL, Ceresini PC, Claridge GF, Coelho G, Coimbra VRM, Costa LA, da Cunha KC, da Silva SS, Daniel R, de Beer ZW, Dueñas M, Edwards J, Enwistle P, Fiuza PO, Fournier J, García D, Gibertoni TB, Giraud S, Guevara-Suarez M, Gusmão LFP, Haituk S, Heykoop M, Hirooka Y, Hofmann TA, Houbraken J, Hughes DP, Kautmanová I, Koppel O, Koukol O, Larsson E, Latha KPD, Lee DH, Lisboa DO, Lisboa WS, López-Villalba Á, Maciel JLN, Manimohan P, Manjón JL, Marincowitz S, Marney TS, Meijer M, Miller AN, Olariaga I, Paiva LM, Piepenbring M, Poveda-Molero JC, Raj KNA, Raja HA, Rougeron A, Salcedo I, Samadi R, Santos TAB, Scarlett K, Seifert KA, Shuttleworth LA, Silva GA, Silva M, Siqueira JPZ, Souza-Motta CM, Stephenson SL, Sutton DA, Tamakeaw N, Telleria MT, Valenzuela-Lopez N, Viljoen A, Visagie CM, Vizzini A, Wartchow F, Wingfield BD, Yurchenko E, Zamora JC, Groenewald JZ. Fungal Planet description sheets: 469–557. *Persoonia*, 2016, 37: 218–403.
- Croxatto A, Prod'hom G, Greub G. Applications of MALDI-TOF mass spectrometry in clinical diagnostic microbiology. *FEMS Microbiol Rev* 2012, 36 : 380–407.
- Dabrowa N, Landau JW, Newcomer VD, Plunkett OA. A survey of tide-washed coastal areas of southern California for fungi potentially pathogenic to man. *Mycopathol Mycol Appl* 1964, 24 :137–150.
- De Carolis E, Posteraro B, Lass-Flörl C, Vella A, Florio AR, Torelli R, Girmenia C, Colozza C, Tortorano AM, Sanguinetti M, Fadda G. Species identification of *Aspergillus*, *Fusarium* and Mucorales with direct surface analysis by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Microbiol Infect* 2012, 18 : 475–484.

- Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, Diouri M, Hallet JN, Bouchara JP. Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2002, 40 : 2108–2114.
- De Hoog GS, Marvin-Sikkema FD, Lahpoor GA, Gottschall JC, Prins RA, Guého E. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses* 1994, 37 : 71–78.
- Del Chierico F, Masotti A, Onori M, Fiscarelli E, Mancinelli L, Ricciotti G, Alghisi F., Dimiziani L, Manetti C, Urbani A, Muraca M, Putignani L. MALDI-TOF MS proteomic phenotyping of filamentous and other fungi from clinical origin. *J Proteomics* 2012, 75 : 3314–3330.
- Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, Prevotat A, Wallet F, Wallaert B, Dei-Cas E, Sime-Ngando T, Chabé M, Viscogliosi E. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community—implications for therapeutic management. *PLoS One* 2012, 7 : e36313.
- De Ravin SS, Challipalli M, Anderson V, Shea YR, Marciano B, Hilligoss D, Marquesen M, Decastro R, Liu YC, Sutton DA, Wickes BL, Kammeyer PL, Sigler L, Sullivan, K., Kang EM, Malech HL, Holland SM, Zelazny AM. *Geosmithia argillacea*: an emerging cause of invasive mycosis in human chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* 2011, 52 : e136–143.
- Desoubeaux G, François N, Poulain D, Courcol R, Chandenier J, Sendid B. Spectrométrie de masse MALDI-TOF, un nouvel outil que la mycologie médicale ne peut contourner. Exploration préliminaire d'une application concernant l'identification de levures isolées dans un CHU français. *J Mycol Méd* 2010, 20 : 263–267.
- De Valk HA, Klaassen CHW, Yntema JB, Hebestreit A, Seidler M, Haase G, Müller FM, Meis JFGM. Molecular typing and colonization patterns of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2009, 8 : 110–114.
- De Vrankrijker AMM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJL, Bonten MJM, Wolfs TFW. *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clin Microbiol Infect* 2011, 17 : 1381–1386.
- Di Sant'agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* 1953a, 12 : 549–563.
- Di Sant'agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Sweat electrolyte disturbances associated with childhood pancreatic disease. *Am J Med* 1953b, 15 : 777–784.
- Dotis J, Roilides E. Osteomyelitis due to *Aspergillus* spp. in patients with chronic granulomatous disease: comparison of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus fumigatus*. *Int J Infect Dis*, 2004, 8 : 103–110.
- Doyon JB, Sutton DA, Theodore P, Dhillon G, Jones KD, Thompson EH, Fu J, Wickes BL, Koehler JE, Schwartz BS. *Rasamsonia argillacea* pulmonary and aortic graft infection in an immune-competent patient. *J Clin Microbiol* 2013, 51 : 719–722.
- Dzawachiszwili N, Landau JW, Newcomer VD, Plunkett OA. The effect of sea water and sodium chloride on the growth of fungi pathogenic to man. *J Invest Dermatol* 1964, 43 : 103–109.

- El Allawy T, Atia M, Amer A. Mycoflora of the pharyngo-tonsillar portion of clinically healthy donkeys [asses] in Assiut [Egypt]. *Assiut Vet Med J* 1977, 4 : 63–69.
- El-Dahr JM, Fink R, Selden R, Arruda LK, Platts-Mills TA, Heymann PW. Development of immune responses to *Aspergillus* at an early age in children with cystic fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 1994, 150 : 1513–1518.
- Emmons CW. The significance of saprophytism in the epidemiology of the mycoses. *Trans N Y Acad Sci* 1954, 17 : 157–166.
- Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. *Hum Mutat* 1997, 10 : 135–154.
- Fahal AH. Mycetoma: a thorn in the flesh. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2004, 98 : 3–11.
- Fiel SB. Clinical management of pulmonary disease in cystic fibrosis. *Lancet* 1993, 341 : 1070–1074.
- Filkins LM, O'Toole GA. Cystic fibrosis lung infections: polymicrobial, complex, and hard to treat. *PLoS Pathog* 2015, 11 : e1005258.
- Fillaux J, Brémont F, Murriss M, Cassaing S, Tétu L, Segonds C, Pipy B., Magnaval JF. *Aspergillus* sensitization or carriage in cystic fibrosis patients. *Pediatr Infect Dis J* 2014, 33 : 680–686.
- Fillaux J, Brémont F, Murriss M, Cassaing S, Rittié JL, Tétu L, Segonds C, Abbal M, Bieth E, Berry A, Pipy B, Magnaval JF. Assessment of *Aspergillus* sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. *Scand J Infect Dis* 2012, 44:842–847.
- Fisher JF, Shadomy S, Teabeaut J, Woodward J, Michaels GE, Newman MA, White E, Cook P, Seagraves A, Yaghamai F, Rissing JP. Near-drowning complicated by brain abscess due to *Petriellidium boydii*. *Arch Neurol* 1982, 39 : 511–513.
- Gallin JI, Zarembek K. Lessons about the pathogenesis and management of aspergillosis from studies in chronic granulomatous disease. *Trans Am Clin Climatol Assoc* 2007, 118 : 175–185.
- García-Peña EI, Hernández S, Favela-Torres E, Auria R, Revah S. Toluene biofiltration by the fungus *Scedosporium apiospermum* TB1. *Biotechnol Bioeng* 2001, 76 : 61–69.
- Ghannoum MA, Jurevic RJ, Mukherjee PK, Cui F, Sikaroodi M, Naqvi A, Gillevet PM. Characterization of the oral fungal microbiome (mycobiome) in healthy individuals. *PLoS Pathog* 2010, 6 : e1000713.
- Gibson LE, Cooke RE. A test for concentration of electrolytes in sweat in cystic fibrosis of the pancreas utilizing pilocarpine by iontophoresis. *Pediatrics* 1959, 23 : 545–549.
- 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.
- Gilgado F, Cano J, Gené 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.

- Gil-Lamaignere C, Roilides E, Hacker J, Müller FMC. Molecular typing for fungi—a critical review of the possibilities and limitations of currently and future methods. *Clin Microbiol Infect* 2003, 9 : 172–185.
- Giraud S, Bouchara JP. *Scedosporium apiospermum* complex: diagnosis and species identification. *Curr Fungal Infect Rep* 2014, 8 : 211–219.
- Giraud S, Favennec L, Bougnoux ME, Bouchara JP. *Rasamsonia argillacea* species complex: taxonomy, pathogenesis and clinical relevance. *Future Microbiol* 2013, 8 : 967–978.
- Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, Carrère J, Degand N, Mély L, Favennec L, Dannaoui E, Bouchara JP, Calenda A. *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2010, 48 : 2381–2386.
- Girodon-Boulandet E, Costa C. Génétique de la mucoviscidose. *Médecine Thérapeutique Pédiatrie* 2005, 8 : 126–134.
- Grant DC, Sutton DA, Sandberg CA, Tyler RD, Thompson EH, Romanelli AM, Wickes BL. Disseminated *Geosmithia argillacea* infection in a German shepherd dog. *Med Mycol* 2009, 47 : 221–226.
- Guarro J, Kantarcioglu AS, Horré R, Rodriguez-Tudela LJ, Cuenca-Estrella M, Berenguer J, De Hoog G.S. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Med Mycol* 2006, 44 : 295–327.
- Gugnani HC. Fungi isolated from lungs of small wilds animals in India. *Mycoses* 1972, 15 : 479–482.
- Gugnani HC, Okafor JI. Mycotic flora of the intestine and other internal organs of certain reptiles and amphibians with special reference to characterization of *Basidiobolus* isolates. *Mycoses* 1980, 23 : 260–268.
- Gugnani HC, Paliwal-Joshi A, Rahman H, Padhye AA, Singh TSK, Das TK, Khanal B, Bajaj R, Rao S, Chukhani R. Occurrence of pathogenic fungi in soil of burrows of rats and of other sites in bamboo plantations in India and Nepal. *Mycoses* 2007, 50 : 507–511.
- Hansen D, Healy M, Reece K, Smith C, Woods GL. Repetitive-sequence-based PCR using the DiversiLab system for identification of *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol* 2008, 46 : 1835–1839.
- Harik NS, Com G, Tang X, Melguizo Castro M, Stemper ME, Carroll JL. Clinical characteristics and epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in children with cystic fibrosis from a center with a high MRSA prevalence. *Am J Infect Control* 2016, 44 : 409–415.
- Hartl D, Gaggar A, Bruscia E, Hector A, Marcos V, Jung A, Greene C, McElvaney G, Mall M, Döring G. Innate immunity in cystic fibrosis lung disease. *J Cyst Fibros* 2012, 11 : 363–382.
- Harun A, Gilgado F, Chen SCA, Meyer W. 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* 2010, 48, S70–S76.
- Harun A, Perdomo H, Gilgado F, Chen SCA, Cano J, Guarro J, Meyer W. Genotyping of *Scedosporium* species: a review of molecular approaches. *Med Mycol* 2009, 47 : 406–414.

- Hay RJ, Mackenzie DWR. The histopathological features of pale grain eumycetoma. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1982, 76 : 839–844.
- Healy M, Reece K, Walton D, Huong J, Frye S, Raad II, Kontoyiannis DP. Use of the DiversiLab system for species and strain differentiation of *Fusarium* species isolates. *J Clin Microbiol* 2005, 43 : 5278–5280.
- 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.
- Hector A, Frey N, Hartl D. Update on host-pathogen interactions in cystic fibrosis lung disease. *Mol Cell Pediatr* 2016, 3 : 1–3.
- Hirschi S, Letscher-Bru V, Pottecher J, Lannes B, Jeung MY, Degot T, Santelmo N, Sabou AM, Herbrecht R, Kessler R. Disseminated *Trichosporon mycotoxinivorans*, *Aspergillus fumigatus*, and *Scedosporium apiospermum* coinfection after lung and liver transplantation in a cystic fibrosis patient. *J Clin Microbiol* 2012, 50, 4168–4170.
- Hong G, White M, Lechtzin N, West NE, Avery R, Miller H, Lee R, Lovari RJ, Massire C, Blyn LB, Liang X, Sutton DA, Fu J, Wickes BL, Wiederhold NP, Zhang SX. Fatal disseminated *Rasamsonia* infection in cystic fibrosis post-lung transplantation. *J Cyst Fibros* 2017, 16 : e3–e7.
- Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Nidermajer S, Reiffert SM. Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients. *Respir Int Rev Thorac Dis* 2009, 77 : 320–324.
- Horsley A, Cunningham S, Innes JA. *Cystic fibrosis* (Oxford Respiratory Medicine Library), second edition. Oxford University Press. 2015. 188 pp.
- Houbraken J, Giraud S, Meijer M, Bertout S, Frisvad JC, Meis JF, Bouchara JP, Samson RA. Taxonomy and antifungal susceptibility of clinically important *Rasamsonia* species. *J Clin Microbiol* 2013, 51 : 22–30.
- 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.
- Howard SJ, Harrison E, Bowyer P, Varga J, Denning DW. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrob Agents Chemother* 2011, 55 : 4802–4809.
- Huang YJ, LiPuma JJ. The microbiome in cystic fibrosis. *Clin Chest Med* 2016, 37 : 59–67.
- Idris AH, Berg RA, Bierens J, Bossaert L, Branche CM, Gabrielli A, Graves SA, Handley AJ, Hoelle R, Morley PT, Papa L, Pepe PE, Quan L, Szpilman D, Wigginton JG, Modell, JH, American Heart Association. Recommended guidelines for uniform reporting of data from drowning: the “Utstein style.” *Circulation* 2003, 108 : 2565–2574.
- Ishiwada N, Takeshita K, Yaguchi T, Nagasawa K, Takeuchi N, Hishiki H, Watanabe A, Kamei K, Shimojo N. The first case of invasive mixed-mold infections due to *Emericella nidulans* var. *echinulata* and *Rasamsonia piperina* in a patient with chronic granulomatous disease. *Mycopathologia* 2015, 181 : 305–309.
- Janda-Ulfig K, Ulfig K, Cano J, Guarro J. 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* 2008, 15 : 45–49.

- Jang JH, Lee JH, Ki CS, Lee NY. Identification of clinical mold isolates by sequence analysis of the internal transcribed spacer region, ribosomal large-subunit D1/D2, and  $\beta$ -tubulin. *Ann Lab Med* 2012, 32 : 126–132.
- Jimenez AL, Salvo NL. Mycetoma or synovial sarcoma? A case report with review of the literature. *J Foot Ankle Surg* 2011, 50 : 569–576.
- Kaltseis J, Rainer J, de Hoog GS. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Med Mycol* 2009, 47 : 398–405.
- Kantarcioglu AS, Guarro J, de Hoog GS. Central nervous system infections by members of the *Pseudallescheria boydii* species complex in healthy and immunocompromised hosts: epidemiology, clinical characteristics and outcome. *Mycoses* 2008, 51 : 275–290.
- Kantarcioglu AS, de Hoog GS, Guarro J. Clinical characteristics and epidemiology of pulmonary pseudallescheriasis. *Rev Iberoam Micol* 2012, 29 : 1–13.
- Katragkou A, Dotis J, Kotsiou M, Tamiolaki M, Roilides E. *Scedosporium apiospermum* infection after near-drowning. *Mycoses* 2007, 50 : 412–421.
- Kawalilak LT, Chen AV, Roberts GR. Imaging characteristics of disseminated *Geosmithia argillacea* causing severe diskospondylitis and meningoencephalomyelitis in a dog. *Clin Case Rep* 2015, 3 : 901–906.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 1989, 245 : 1073–1080.
- Kirk PW. A comparison of saline tolerance and sporulation in marine and clinical isolates of *allescheria boydii* Shear. *Mycopathol Mycol Appl* 1967, 33 : 65–75.
- Klaassen CHW. MLST versus microsatellites for typing *Aspergillus fumigatus* isolates. *Med Mycol* 2009, 47 Suppl 1 : S27–33.
- Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzky JT, Boucher RC. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* 1983, 221 : 1067–1070.
- Koch C, Høiby N. Diagnosis and treatment of cystic fibrosis. *Respir Int Rev Thorac Dis* 2000, 67 : 239–247.
- Ko WH, Tsou YJ, Ju YM, Hsieh HM, Ann PJ. Production of a fungistatic substance by *Pseudallescheria boydii* isolated from soil amended with vegetable tissues and its significance. *Mycopathologia* 2009, 169 : 125–131.
- Kramer R, Sauer-Heilborn A, Welte T, Guzman CA, Abraham WR, Höfle MG. A cohort study of the airway mycobiome in adult cystic fibrosis patients: differences in community structure of fungi compared to bacteria reveal predominance of transient fungal elements. *J Clin Microbiol* 2015, 53 : 2900–2907.
- Kreda SM, Davis CW, Rose MC. CFTR, mucins, and mucus obstruction in cystic fibrosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012, 2 : a009589.

- Krzewinski JW, Nguyen CD, Foster JM, Burns JL. Use of random amplified polymorphic DNA PCR to examine epidemiology of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans* from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2001, 39 : 3597–3602.
- Kurup PV, Schmitt JA. Human-pathogenic fungi in the soils of central Ohio. *Ohio J Sci* 1970, 70 : 291–295.
- Labbé F, Babchia S, Evreux F, Chenal P. Isolement de *Geosmithia argillacea* chez un enfant atteint de mucoviscidose. *J Mycol Méd* 2013, 23 : 176–178.
- Lackner M, De Hoog GS, Yang L, Moreno LF, Ahmed SA, Andreas F, Kaltseis J, Nagl M, Lass-Flörl C, Risslegger B, Rambach G, Speth C, Robert V, Buzina W, Chen S, Bouchara JP, Cano-Lira JF, Guarro J, Gené J, Silva FF, Haido R, Haase G, Havlicek V, Garcia-Hermoso D, Meis JF, Hagen F, Kirchmair M, Rainer J, Schwabenbauer K, Zoderer M, Meyer W, Gilgado F, Schwabenbauer K, Vicente VA, Piecková E, Regenermel M, Rath PM, Steinmann J, Alencar XW de, Symoens F, Tintelnot K, Ulfing K, Velegriki A, Tortorano AM, Giraud S, Mina S, Rigler-Hohenwarter K, Hernando FL, Ramirez-Garcia A, Pellon A, Kaur J, Bergter EB, Meirelles JV de, Silva ID da, Delhaes L, Alastruey-Izquierdo A, Li R, Lu Q, Moussa T, Almaghrabi O, Al-Zahrani H, Okada G, Deng S, Liao W, Zeng J, Issakainen J, Lopes LCL. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Divers* 2014, 67 : 1–10.
- Lackner M, Guarro J. Pathogenesis of *Scedosporium*. *Curr Fungal Infect Rep* 2013, 7 : 326–333.
- Lackner M, Hagen F, Meis JF, Ende AHGG van den, Vu D, Robert V, Fritz J, Moussa TAA, de Hoog GS. Susceptibility and diversity in the therapy-refractory genus *Scedosporium*. *Antimicrob Agents Chemother* 2014, 58 : 5877–5885.
- Lackner M, Rezusta A, Villuendas MC, Palacian MP, Meis JF, Klaassen CH. Infection and colonisation due to *Scedosporium* in Northern Spain. An *in vitro* antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates. *Mycoses* 2011, 54 : 12–21.
- Lake FR, Tribe AE, McAleer R, Froudust J, Thompson PJ. Mixed allergic bronchopulmonary fungal disease due to *Pseudallescheria boydii* and *Aspergillus*. *Thorax* 1990, 45 : 489–491.
- LiPuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clin Microbiol Rev* 2010, 23 : 299–323.
- Liu JC, Modha DE, Gaillard EA. What is the clinical significance of filamentous fungi positive sputum cultures in patients with cystic fibrosis? *J Cyst Fibros* 2013, 12 : 187–193.
- Luplertlop N, Pumeesat P, Muangkaew W, Wongsuk T, Alastruey-Izquierdo A. Environmental screening for the *Scedosporium apiospermum* species complex in public parks in Bangkok, Thailand. *PLoS One* 2016, 11(7) : e0159869.
- Machouart M, Garcia-Hermoso D, Rivier A, Hassouni N, Catherinot E., Salmon A, Debourgogne A, Coignard H, Lecuit M, Bougnoux ME, Blanche S, Lortholary O. Emergence of disseminated infections due to *Geosmithia argillacea* in patients with chronic granulomatous disease receiving long-term azole antifungal prophylaxis. *J Clin Microbiol* 2011, 49 : 1681–1683.

- Maheshwari R, Bharadwaj G, Bhat MK. Thermophilic fungi: their physiology and enzymes. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000, 64 : 461–488.
- Maiden MCJ, Bygraves JA, Feil E, Morelli G, Russell JE, Urwin R, Zhang Q, Zhou J, Zurth K, Caugant DA, Feavers IM, Achtman M, Spratt BG. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998, 95 : 3140–3145.
- Manso E, Cariani L, Fiscarelli E, Ravenni N. Isolation of filamentous fungi in the sputum of cystic fibrosis patients in Italy: state of the art and epidemiology. 2<sup>nd</sup> Meeting of the ECMM/ISHAM working group *Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis (Fri-CF)*, Angers (France), 1<sup>er</sup>-2 septembre 2011.
- Marguet C, Favennec L, Matray O, Bertout S, Giraud S, Couderc L, Zouhair R, Leguillon C, Gargala G, Ballet JJJ, Bouchara JP. Clinical and microbiological efficacy of micafungin on *Geosmithia argillacea* infection in a cystic fibrosis patient. *Med Mycol Case Rep* 2012, 1 : 79–81.
- Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med Mycol* 2014, 52 : 179–186.
- Matos T, Cerar T, Praprotnik M, Krivec U, Pirš M. First recovery of *Rasamsonia argillacea* species complex isolated in adolescent patient with cystic fibrosis in Slovenia – case report and review of literature. *Mycoses* 2015, 58 : 506–510.
- Mcdonough ES, Ajello L, Ausherman RJ, Balows A, McClellan JT, Brinkman S. Human pathogenic fungi recovered from soil in an area endemic for North American blastomycosis. *Am J Epidemiol* 1961, 73 : 75–83.
- McMahon MA, Chotirmall SH, McCullagh B, Branagan P, McElvaney NG, Logan PM. Radiological abnormalities associated with *Aspergillus* colonization in a cystic fibrosis population. *Eur J Radiol* 2012, 81 : e197–202.
- Merino A de P, Bütschi FN, Bouchardy I, Beckmann JS, Morris MA, Hafen GM, Fellmann F. [R74W;R1070W;D1270N]: A new complex allele responsible for cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2010, 9 : 447–449.
- Miller MA, Greenberger PA, Amerian R, Toogood JH, Noskin GA, Roberts M, Patterson R. Allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Pseudallescheria boydii*. *Am Rev Respir Dis* 1993, 148 : 810–812.
- Monaghan KG, Feldman GL. The risk of cystic fibrosis with prenatally detected echogenic bowel in an ethnically and racially diverse North American population. *Prenat Diagn* 1999, 19 : 604–609.
- Morio F, Horeau-Langlard D, Gay-Andrieu F, Talarmin JP, Haloun A, Treilhaud M, Despins P, Jossic F, Nourry L, Danner-Boucher I, Pattier S, Bouchara JP, Le Pape P, Miègeville M. Disseminated *Scedosporium/Pseudallescheria* infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 2010, 48 : 1978–1982.
- Mouchacca J. Thermophilic fungi : biodiversity and taxonomic status. *Cryptogam Mycol* 1997, 18 : 19–69.
- Muthig M, Hebestreit A, Ziegler U, Seidler M, Müller FM. Persistence of *Candida* species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Med Mycol* 2010, 48 : 56–63.



- Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, Goldsmith CE, Moore JE. 117: Identification of airborne fungi in an adult CF unit. *J Cyst Fibros* 2007, 6 Suppl 1 : S29.
- Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, Walker JM, Goldsmith CE, Rendall J, Moore JE. Comparison of techniques to examine the diversity of fungi in adult patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* 2010, 48 : 166–176.
- Neuvéglise C, Sarfati J, Debeaupuis JP, Thien HV, Just J, Tournier G, Latgé JP. Longitudinal study of *Aspergillus fumigatus* strains isolated from cystic fibrosis patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1997, 16 : 747–750.
- Nguyen LDN, Viscogliosi E, Delhaes L. The lung mycobiome: an emerging field of the human respiratory microbiome. *Front Microbiol* 2015, 6 : 89.
- Niu L, Li Y, Xu L, Wang P, Zhang W, Wang C, Cai W, Wang L. Ignored fungal community in activated sludge wastewater treatment plants: diversity and altitudinal characteristics. *Environ Sci Pollut Res* 2016, 1–9.
- O'Donnell K, Sutton DA, Rinaldi MG, Magnon KC, Cox PA, Revankar SG, Sanche S, Geiser DM, Juba JH, van Burik JAH, Padhye A, Anaissie EJ, Francesconi A, Walsh TJ, Robinson JS. Genetic diversity of human pathogenic members of the *Fusarium oxysporum* complex inferred from multilocus DNA sequence data and amplified fragment length polymorphism analyses: evidence for the recent dispersion of a geographically widespread clonal lineage and nosocomial origin. *J Clin Microbiol* 2004, 42 : 5109–5120.
- Packeu A, Lebecque P, Rodriguez-Villalobos H, Boeras A, Hendrickx M, Bouchara JP, Symoens F. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Exophiala* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Med Microbiol* 2012, 61 : 1226–1233.
- Parize P, Billaud S, Bienvenu AL, Bourdy S, le Pogam MA, Reix P, Picot S, Robert R, Lortholary O, Bouchara JP, Durieu I. Impact of *Scedosporium apiospermum* complex seroprevalence in patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2014, 13 : 667–673.
- Pashley CH, Fairs A, Free RC, Wardlaw AJ. DNA analysis of outdoor air reveals a high degree of fungal diversity, temporal variability, and genera not seen by spore morphology. *Fungal Biol* 2012a, 116 : 214–224.
- Pashley CH, Fairs A, Morley JP, Taylor S, Agbetile J, Bafadhel M, Brightling CE, Wardlaw AJ. Routine processing procedures for isolating filamentous fungi from respiratory sputum samples may underestimate fungal prevalence. *Med Mycol* 2012b, 50 : 433–438.
- Paugam A, Baixench MT, Demazes-Dufeu N, Burgel PR, Sauter E, Kanaan R, Dusser D, Dupouy-Camet J, Hubert D. 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.
- Pawar VH, Padhye AA, Thirumalachar MJ. Isolation of *Monosporium apiospermum* from marine soil in Bombay. *Hindustan Antibiot Bull* 1963, 6 : 50–53.
- Pham T, Giraud S, Schuliar G, Rougeron A, Bouchara JP. Scedo-Select III: a new semi-selective culture medium for detection of the *Scedosporium apiospermum* species complex. *Med Mycol* 2015, 53 : 512–519.
- Pihet M, Carrère J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, Bouchara JP. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis--a review. *Med Mycol* 2009, 47 : 387–397.

- Pinto MR, Mulloy B, Haido RMT, Travassos LR, Barreto Bergter E. A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen. *Microbiology* 2001, 147 : 1499–1506.
- Pitt JI. *Geosmithia* gen. nov. for *Penicillium lavendulum* and related species. *Can J Bot* 1979, 57 : 2021–2030.
- Polonelli L, Morace G, Barcaioli BM, Cossu AL. Survey of human pathogenic actinomycetes and fungi in soil from Rome and other Italian areas. *Mycopathologia* 1981, 73 : 161–169.
- Pounder JI, Hansen D, Woods GL. Identification of *Histoplasma capsulatum*, *Blastomyces dermatitidis*, and *Coccidioides* species by repetitive-sequence-based PCR. *J Clin Microbiol* 2006, 44:2977–2982.
- Pounder JI, Williams S, Hansen D, Healy M, Reece K, Woods GL. Repetitive-sequence-PCR-based DNA fingerprinting using the Diversilab system for identification of commonly encountered dermatophytes. *J Clin Microbiol* 2005, 43:2141–2147.
- Quint A, Lerer I, Sagi M, Abeliovich D. Mutation spectrum in Jewish cystic fibrosis patients in Israel: Implication to carrier screening. *Am J Med Genet A* 2005, 136 : 246–248.
- Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. *Nature* 1983, 301 : 421–422.
- Rainer J, Kaltseis J, De Hoog SG, Summerbell RC. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* 2007a, 93 : 315–322.
- Rainer J, Kaltseis J, Mayr A, Lass-Flörl C, Dierich M. Semi-selective medium for the isolation of *Scedosporium* from CF-patients. 2<sup>nd</sup> meeting of the ECMM/ISHAM Working group on *Pseudallescheria/Scedosporium* infections, Angers (France), 7-8 juin 2007.
- Ramirez R, Robertstad GW, Hutchinson LR, Chavez J. Mycotic flora in the lower digestive tract of feral pigeons (*Columba livia*) in the El Paso, Texas area. *J Wildl Dis* 1976, 12 : 83–85.
- Ramirez-Garcia A, Pellon A, Rementería A, Buldain I, Barreto-Berguer E, Rollin-Pinheiro R, Vieira de Meirelles J, Xisto MI, Ranque S, Havlicek V, Vandeputte P, Le Govic Y, Bouchara JP, Giraud S, Chen S, Rainer J, Alastruey-Izquierdo A, Martin-Gomez MT, López-Soria LM, Peman J, Schwarz C, Bernhard A, Tintelnot K, Capilla J, Martin Vicente A, Cano-Lira J, Nagl M, Lackner M, Irinyi L, Meyer W, de Hoog S, Hernando FL. *Scedosporium* complex and *Lomentospora prolificans*: an updated overview of underrated opportunist. *Med Mycol* 2017.
- Ramos CA, Viegas C, Verde SC, Wolterbeek HT, Almeida SM. Characterizing the fungal and bacterial microflora and concentrations in fitness centres. *Indoor Built Environ* 2016, 25 : 872–882.
- Ratbi I, Génin E, Legendre M, Le Floch A, Costa C, Cherkaoui-Deqqaqi S, Goossens M, Sefiani A, Girodon E. Cystic fibrosis carrier frequency and estimated prevalence of the disease in Morocco. *J Cyst Fibros* 2008, 7 : 440–443.
- Renders NH, van Belkum A, Overbeek SE, Mouton JW, Verbrugh HA. Molecular epidemiology of *Staphylococcus aureus* strains colonizing the lungs of related and unrelated cystic fibrosis patients. *Clin Microbiol Infect* 1997, 3 : 216–221.

- Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, de la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, Calderon E, Varela JM. Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clin Microbiol Infect* 2005, 11 : 1012–1015.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Ai E. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 1989, 245 : 1066–1073.
- Rippon JW, Carmichael JW. Petriellidiosis (allescheriosis): four unusual cases and review of literature. *Mycopathologia* 1976, 58 : 117–124.
- Rogers AL, Beneke ES. Human pathogenic fungi recovered from Brazilian soil. *Mycopathol Mycol Appl* 1964, 22 : 15–20.
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, Ai E. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* 1989, 245 : 1059–1065.
- Rougeron A, Giraud S, Alastruey-Izquierdo A, Cano-Lira J, Rainer J, Mouhajir A, Le Gal S, Nevez G, Meyer W, Bouchara JP. Ecology of *Scedosporium* species: present knowledge and future research. *Mycopathologia* 2017 Sep 19. doi: 10.1007/s11046-017-0200-2.
- Rougeron A, Giraud S, Razafimandimby B, Meis JF, Bouchara JP, Klaassen CHW. Different colonization patterns of *Aspergillus terreus* in patients with cystic fibrosis. *Clin Microbiol Infect* 2014, 20 : 327–333.
- Rougeron A, Schuliar G, Leto J, Sitterlé E, Landry D, Bougnoux ME, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S. Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* species complex. *Environ Microbiol* 2015, 17 : 1039–1048.
- Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. *N Engl J Med* 2005, 352 : 1992–2001.
- Ruiz-Díez B, Martín-Díez F, Rodríguez-Tudela JL, Álvarez M, Martínez-Suárez JV. Use of random amplification of polymorphic DNA (RAPD) and PCR-fingerprinting for genotyping a *Scedosporium prolificans* (*inflatum*) outbreak in four leukemic patients. *Curr Microbiol* 1997, 35 : 186–190.
- Sahi H, Avery RK, Minai OA, Hall G, Mehta AC, Raina P, Budev M. *Scedosporium apiospermum* (*Pseudoallescheria boydii*) infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* 2007, 26 : 350–356.
- Saldanha R, Manno M, Saleh M, Ewaze JO, Scott JA. The influence of sampling duration on recovery of culturable fungi using the Andersen N6 and RCS bioaerosol samplers. *Indoor air*, 2008, 18 : 464–472.
- Salgüero R, Borman AM, Herrtage M, Benchekroun G, Abbondati E, Piola V, Vanhaesebrouck A. *Rasamsonia argillacea* mycosis in a dog: first case in Europe. *Vet Rec* 2013, 172 : 581–581.
- San Millán R, Quindós G, Garaizar J, Salesa R, Guarro J, Pontón J. Characterization of *Scedosporium prolificans* clinical isolates by randomly amplified polymorphic DNA analysis. *J Clin Microbiol* 1997, 35 : 2270–2274.

- Santos C, Paterson RE, Venâncio A, Lima N. Filamentous fungal characterizations by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. *J Appl Microbiol* 2010, 108 : 375–385.
- Sarles J, Barthelémy S, Ferec C, Iovanna J, Roussey M, Farriaux J, Toutain A, Berthelot J, Maurin N, Codet J, Berthezene P, Dagorn J. Blood concentrations of pancreatitis associated protein in neonates: relevance to neonatal screening for cystic fibrosis. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 1999, 80 : F118–F122.
- Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, Albert F, Peter S, Würstl B, Wagner S, Klotz M, Becker A, Haase G, Laniado G, Kahl B, Suerbaum S, Seibold M, Tintelnot K. Prevalence of *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. *J Cyst Fibros* 2015, 14 : 237–241.
- Segal BH, Leto TL, Gallin JI, Malech HL, Holland SM. Genetic, biochemical, and clinical features of chronic granulomatous disease. *Medicine (Baltimore)* 2000, 79 : 170–200.
- Severo LC, Oliveira F de M, Irion K. Respiratory tract intracavitary colonization due to *Scedosporium apiospermum*: report of four cases. *Rev Inst Med Trop São Paulo* 2004, 46 : 43–46.
- Sidot C, Simon P, Bouchara JP, Chabasse D, Urban T, Giniès JL. 116: *Scedosporium apiospermum*. Environmental study in the homes of patients with cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2007, 6 Suppl 1 : S29.
- Sitterlé E, Giraud S, Leto J, Bouchara, JP, Rougeron A, Morio F, Dauphin B, Angebault C, Quesne G, Beretti JL, Hassouni N, Nassif X, Bougnoux ME. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/Scedosporium* species. *Clin Microbiol Infect* 2014, 20 : 929–935.
- Sohn JY, Jang MA, Lee JH, Park KS, Ki CS, Lee NY. Isolation and identification of *Geosmithia argillacea* from a fungal ball in the lung of a tuberculosis patient. *Ann Lab Med* 2013, 33 : 136–140.
- Sotgiu G, Mazzoni A, Mantovani A, Ajello L, Palmer J. 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* 1966, 83 : 329–337.
- Steinmann J, Giraud S, Schmidt D, Sedlacek L, Hamprecht A, Houbraken J, Meis JF, Bouchara, JP, Buer J, Rath PM. Validation of a novel real-time PCR for detecting *Rasamsonia argillacea* species complex in respiratory secretions from cystic fibrosis patients. *New Microbes New Infect* 2014, 2 : 72–78.
- Steinmann J, Schmidt D, Buer J, Rath PM. Discrimination of *Scedosporium prolificans* against *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium apiospermum* by semiautomated repetitive sequence-based PCR. *Med Mycol* 2011, 49 : 475–483.
- Stewart C, Pepper MS. Cystic fibrosis on the African continent. *Genet Med* 2016, 18 : 653–662.
- Stolk AC, Evans HC, Nilsson T. *Penicillium argillaceum* sp. nov., a thermotolerant *Penicillium*. *Trans Br Mycol Soc* 1969, 53 : 307–311.
- Summerbell RC, Kraiden S, Kane J. Potted plants in hospitals as reservoirs of pathogenic fungi. *Mycopathologia* 1989, 106 : 13–22.

- Su YY, Cai L. *Rasamsonia composticola*, a new thermophilic species isolated from compost in Yunnan, China. *Mycol Prog* 2013, 12 : 213–221.
- Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, Denis O, Estenne M, Nolard N, Jacobs F. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *J Heart Lung Transplant* 2006, 25 : 603–607.
- Tanney JB, Seifert KA. *Rasamsonia pulvericola* sp. nov., isolated from house dust. *IMA Fungus* 2013, 4 : 205–212.
- Terpstra P, Westreenen MV, Croughs P, Verweij PE, Brimicombe R, Yntema JB, Klaassen CH, Merkus PJ, Meis JF and Dutch CF Fungal Bank Consortium. Epidemiology of filamentous fungi in cystic fibrosis patients in the Netherlands: one year survey. 2011. 2<sup>nd</sup> Meeting of the ECMM/ISHAM Working group *Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis (Fri-CF)*, Angers (France), 1<sup>er</sup>-2 septembre 2011.
- Thomson S, Alibhai K, Winkelaar G, Lien D, Halloran K, Kapasi A, Weinkauf J. Case report of vertebral osteomyelitis and mycotic abdominal aortic aneurysm caused by *Scedosporium apiospermum* in a lung transplant patient with cystic fibrosis. *Transplant Proc* 2015, 47 : 204–209.
- Thornton CR. Tracking the emerging human pathogen *Pseudallescheria boydii* by using highly specific monoclonal antibodies. *Clin Vaccine Immunol* 2009, 16 : 756–764.
- Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, Johnson E, Meletiadis J, Pana ZD, Lackner M, Verweij P, Freiburger T, Cornely OA, Arikan-Akdagli S, Dannaoui E, Groll AH, Lagrou K, Chakrabarti A, Lanternier F, Pagano L, Skiada A, Akova M, Arendrup MC, Boekhout T, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Guinea J, Guarro J, de Hoog GS, Hope W, Kathuria S, Lortholary O, Meis JF, Ullmann AJ, Petrikos G, Lass-Flörl C. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clin Microbiol Infect* 2014, 20 : 27–46.
- Touati K, Nguyen DNL, Delhaes L. The airway colonization by opportunistic filamentous fungi in patients with cystic fibrosis: recent updates. *Curr Fungal Infect Rep* 2014, 8 : 302–311.
- Valentin T, Neumeister P, Pichler M, Rohn A, Koidl C, Haas D, Heiling B, Asslaber M, Zollner-Schwetz I, Hoenigl M, Salzer HJF, Krause R, Buzina W. Disseminated *Geosmithia argillacea* infection in a patient with gastrointestinal GvHD. *Bone Marrow Transplant* 2012, 47 : 734–736.
- Van Ewijk BE, van der Zalm MM, Wolfs TFW, van der Ent CK. Viral respiratory infections in cystic fibrosis. *J Cyst Fibros* 2005, 4 Suppl 2 : 31–36.
- Vanhee LME, 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.
- Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman JJ. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *J Cyst Fibros* 2002, 1 : 13–29.
- Varsavsky E. Occurrence of keratinophilic human pathogenic fungi in soils of Argentina. *Mycopathol Mycol Appl* 1964, 22 : 81–90.

- Verweij PE, Meis JF, Sarfati J, Hoogkamp-Korstanje JA, Latgé JP, Melchers WJ. Genotypic characterization of sequential *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* 1996, 34 : 2595–2597.
- Vinh DC, Shea YR, Sugui, JA, Parrilla-Castellar ER, Freeman AF, Campbell JW, Pittaluga S, Jones PA, Zelazny A, Kleiner D, Kwon-Chung KJ, Holland SM. Invasive aspergillosis due to *Neosartorya udagawae*. *Clin Infect Dis* 2009, 49 : 102–111.
- Vissiennon T. [Fungal flora in chicken stalls and its etiopathogenic importance for humans and animals]. *Berl Münch Tierärztl Wochenschr* 1999, 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. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 1995, 23 : 4407–4414.
- Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell* 1993, 73 : 1251–1254.
- Willger SD, Grim SL, Dolben EL, Shipunova A, Hampton TH, Morrison HG, Filkins LM, O'Toole GA, Moulton LA, Ashare A, Sogin ML, Hogan DA. Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome* 2014, 2 : 40.
- Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 1990, 18 : 6531–6535.
- Wise MG, Healy M, Reece K, Smith R, Walton D, Dutch W, Renwick A, Huong J, Young S, Tarrand J, Kontoyiannis DP. Species identification and strain differentiation of clinical *Candida* isolates using the DiversiLab system of automated repetitive sequence-based PCR. *J Med Microbiol* 2007, 56:778–787.
- World Health Organisation. The molecular genetic epidemiology of cystic fibrosis. Report of a joint meeting of WHO/ECFTN/ICF(M)A/ECFS, Genoa (Italy), 19 juin 2002. WHO/HGN/CF/WG/04.02. 2002.
- Yaguchi T, Udagawa S, Nishimura K. *Geosmithia argillacea* is the anamorph of *Talaromyces eburneus* as a heat resistant fungus. *Cryptogam Mycol* 2005, 26 : 133–141.
- Zouhair R, Defontaine A, Ollivier C, Cimon B, Symoens F, Hallet JN, Deunff J, Bouchara JP. Typing of *Scedosporium apiospermum* by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA. *J Med Microbiol* 2001 50: 925–932.
- Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S. Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* 2013, 51 : 603–613.

## Thèse de Doctorat en Cotutelle Internationale

MOUHAJIR Abdelmounaim

### Caractérisation moléculaire et épidémiologique de pathogènes fongiques émergents dans la mucoviscidose : *Scedosporium* spp et *Rasamsonia* spp

### Molecular and epidemiologic characterization of emerging fungal pathogens in the cystic fibrosis: *Scedosporium* spp and *Rasamsonia* spp

#### Résumé

Dans la mucoviscidose, le tableau clinique est dominé par les infections respiratoires qui constituent la cause majeure de morbidité. Diverses espèces fongiques sont décrites dans ces infections, notamment les *Scedosporium* et le complexe *Rasamsonia argillacea* pour lesquels les connaissances restent limitées. Dans ce travail, nous avons évalué l'intérêt de l'amplification des séquences répétitives de l'ADN pour la différenciation spécifique et infraspécifique de ces champignons. La rep-PCR a d'abord été appliquée à l'analyse d'isolats du genre *Scedosporium*. La rep-PCR a produit des résultats concordants avec ceux obtenus par séquençage du gène de la bêta-tubuline, amplification aléatoire de fragments d'ADN polymorphes et séquençage multi-loci. Elle permet également l'identification précise des espèces au sein du complexe *R. argillacea*. L'analyse des résultats obtenus sur 116 isolats a montré la capacité de ces champignons à coloniser de manière chronique les voies respiratoires, un même profil électrophorétique étant observé généralement chez un même patient. Enfin, nous avons produit de nouvelles données sur l'écologie des *Scedosporium* en étudiant différents biotopes au Maroc. Comme précédemment rapporté, ces champignons préfèrent les environnements impactés par les activités humaines. On les rencontre dans des sols de pH neutre, riches en matières organiques et pauvres en sels. Enfin, si *S. apiospermum* était l'espèce la plus abondante, *S. boydii*, *S. aurantiacum* et *S. dehoogii* ont été rencontrés avec des fréquences comparables. En conclusion, les données générées renforcent nos connaissances sur l'épidémiologie des infections causées par ces pathogènes émergents.

#### Mots clés

Mucoviscidose, *Scedosporium* spp., complexe *Rasamsonia argillacea*, rep-PCR, génotypage, écologie

#### Abstract

In cystic fibrosis (CF), respiratory infections are the leading cause of morbidity and mortality. Bacteria are the most common causative agents of these infections, but an increasing number of fungal species may also be found, including *Scedosporium* species and species of the *Rasamsonia argillacea* complex. In order to improve our knowledge on the epidemiology of these infections, here we evaluated the interest of PCR amplification of repetitive DNA sequences (rep-PCR) for species identification and strain delineation. rep-PCR was applied to the retrospective analysis of a panel of 63 isolates belonging to the *Scedosporium* genus. Results were consistent with those obtained by beta-tubulin gene sequencing, random amplification of polymorphic DNA and Multilocus Sequence Typing. rep-PCR also permitted precise species identification in the *R. argillacea* complex. Analysis of the data obtained on 116 isolates revealed the capacity of these fungi to chronically colonize the airways of patients with CF, a unique electrophoretic profile being observed usually for each patient. Finally, we produced in this thesis new data about the ecology of *Scedosporium* species by studying different biotopes in Morocco. As previously reported, these fungi are mainly found in human-impacted areas. Also they prefer soils with a neutral pH, a high organic matter content and a very low mineral salts content. In addition, if *S. apiospermum* was by far the predominant species, *S. boydii*, *S. aurantiacum* and *S. dehoogii* were encountered with similar frequencies. In conclusion, data provided here reinforce our knowledge on the epidemiology of the infections caused by these emerging pathogens.

#### Key Words

Cystic fibrosis, *Scedosporium* species, *Rasamsonia argillacea* species complex, rep-PCR, genotyping, ecology