



HAL
open science

Épidémiologie et sensibilité aux antifongiques des espèces cryptiques d'*Aspergillus*

Sébastien Imbert

► **To cite this version:**

Sébastien Imbert. Épidémiologie et sensibilité aux antifongiques des espèces cryptiques d'*Aspergillus*. Mycologie. Sorbonne Université, 2020. Français. NNT : 2020SORUS237 . tel-03380417

HAL Id: tel-03380417

<https://theses.hal.science/tel-03380417>

Submitted on 15 Oct 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Sorbonne Université

École doctorale complexité du vivant

*Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses CIMI-Paris, UPMC UMRS CR7,
INSERM U1135, CNRS ERL 8255*

Épidémiologie et sensibilité aux antifongiques des espèces cryptiques d'*Aspergillus*

Par Sébastien Imbert

POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE SORBONNE UNIVERSITE

Présentée et soutenue publiquement le 26 octobre 2020

Devant un jury composé de :

Monsieur le Professeur Patrice Le Pape

Madame le Docteur Marie-Elisabeth Bougnoux

Madame le Professeur Laurence Delhaes

Monsieur le Professeur Renaud Piarroux

Monsieur le Docteur Arnaud Fekkar

Président - Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Examineur

Directeur de thèse



Remerciements

Avant toute chose je souhaiterais remercier les personnes qui m'ont soutenu tout au long de mes études et au cours de la rédaction de cette thèse :

Monsieur le Professeur Patrice Le Pape qui me fait l'honneur et le plaisir d'accepter de présider cette thèse.

Monsieur le Docteur Arnaud Fekkar, directeur de cette thèse, pour m'avoir fait confiance pendant plus de 8 ans, d'interne à assistant, et pour ses conseils et remarques avisés lors de ce travail.

Madame le Docteur Anne Cécile Normand, pour s'être bien « amusée » avec moi avec les *Aspergillus*, mais aussi pour la qualité de ses conseils et de son soutien lors de cette thèse.

Monsieur le Professeur Renaud Piarroux, pour m'avoir accueilli en tant qu'assistant au sein du service de Parasitologie Mycologie de la Pitié Salpêtrière et pour m'avoir laissé l'opportunité de « m'amuser » avec MSI.

Madame le Professeur Laurence Delhaes, pour m'avoir donné l'opportunité de m'épanouir vers de nouveaux horizons.

Madame le Docteur Marie-Elisabeth Bougnoux qui me fait l'honneur et le plaisir d'accepter d'être membre du jury pour la deuxième fois, après la thèse d'exercice de Docteur en Pharmacie

Madame le Professeur Laurence Lachaud et Mesdames et Messieurs les Docteurs Damien Costa, Christine Bonnal, Frédéric Gabriel, Sophie Cassaing, Lise Kristensen, Sophie Brun, Lilia Hasseine, Hélène Raberin et Christine Schuttler, pour avoir accepté de participer à ce projet et pour votre implication dans la transmission des informations et des isolats.

Madame le Professeur Dominique Mazier pour m'avoir accueilli à plusieurs reprises en tant qu'interne au sein du service de Parasitologie Mycologie de la Pitié Salpêtrière.

Monsieur le Docteur Luc Paris pour avoir partagé avec moi ses connaissances médicales et non médicales et pour la qualité de son enseignement et de sa compagnie.

Tout le personnel du laboratoire de Parasitologie Mycologie, et plus particulièrement Martine et Isabelle pour m'avoir accueilli dans la bonne humeur, avoir partagé leurs connaissances et m'avoir donné goût à la discipline.

Les techniciens du laboratoire de séquençage du service de Virologie de la Pitié Salpêtrière pour leur aide technique indispensable

Aude et Flavie, pour avoir partagé ces moments de détente lors des pauses repas dans le parc de la Pitié Salpêtrière

Mes amis, sudistes ou parisiens, pour les bons moments partagés depuis tout ce temps.

Ma famille, mes parents, mes cousins, mon frère Florian, pour leur soutien sans limite depuis toujours. Malgré l'éloignement je pense fort à vous.

Et bien sûr **Laura ma femme**, pour avoir été toujours là depuis presque 15 ans maintenant et avoir réussi la prouesse de me supporter, particulièrement lors de ces derniers mois de rédaction. Sans toi, tout ceci n'aurait pas été possible. Merci d'être là tous les jours avec moi et de partager tous ces moments de joie et de bonheur.

Sommaire

Remerciements.....	1
Sommaire.....	3
Introduction	5
Contexte scientifique.....	6
1. Le genre <i>Aspergillus</i>	6
1.1. Définition	6
1.2. Habitat – cycle biologique.....	6
1.3. Place du genre <i>Aspergillus</i> dans l’environnement.....	9
1.4. Le concept d’espèce au sein du genre <i>Aspergillus</i>	9
2. Outils d’identification des espèces au sein du genre <i>Aspergillus</i>.....	13
2.1. Identification morphologique.....	13
2.2. Identification moléculaire.....	15
2.3. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF.....	18
3. Pouvoir pathogène des champignons du genre <i>Aspergillus</i> chez l’Homme	23
3.1. Généralités.....	23
3.2. Pathologies aspergillaires	24
3.3. Espèces impliquées en pathologie humaine.....	32
4. Sensibilité et résistance des <i>Aspergillus</i> aux antifongiques	36
4.1. Principaux antifongiques à usage médical actifs contre les <i>Aspergillus</i>	36
4.2. Méthodes d’étude de la sensibilité aux antifongiques	38
4.3. Résistance des <i>Aspergillus</i> aux antifongiques.....	42
4.4. Mécanismes impliqués dans la résistance aux antifongiques.....	45
Problématiques – Objectifs.....	49
Matériels et méthodes.....	51
1. Collecte et conservation des isolats.....	51
2. Identification des isolats.....	51
3. Tests de sensibilité aux antifongiques.....	56
4. Collecte des informations sur les isolats	59
Résultats : Identification des espèces cryptiques – Article 1	60
Résultats : Sensibilité aux antifongiques - Article 2.....	72
Résultats : Epidémiologie des espèces cryptiques – Article 3	89
Discussion	98
Conclusion	106
Bibliographie.....	107
Annexes	121
Table des illustrations	149

Table des tableaux..... 150

Introduction

Les champignons du genre *Aspergillus* représentent les moisissures pathogènes les plus fréquemment rencontrées chez l'Homme. Ils peuvent être responsables de tout un spectre de pathologies, allant d'infections superficielles bénignes à des infections invasives profondes de pronostic sombre. Jusqu'à très récemment, seules de rares espèces, dont *A. fumigatus*, étaient considérées comme pathogènes pour l'Homme. Cependant, ces dernières années la taxonomie du genre *Aspergillus* a été transformée en profondeur avec l'introduction du concept d'espèces cryptiques. Il s'en est suivi une augmentation drastique du nombre d'espèces, dont plusieurs dizaines ont été retrouvées dans des prélèvements d'origine humaine, avec une incidence croissante. Ces « nouvelles » espèces cryptiques restent néanmoins difficiles à identifier précisément. Par conséquent, peu de données sont disponibles actuellement sur ces espèces, notamment en termes de pathogénie et de sensibilité aux antifongiques.

Récemment, l'application MSI permettant l'identification des champignons à partir de leurs spectres de masse, a été mise en ligne. Elle possède entre autres, la plus grande base de données de spectres de masse d'espèces cryptiques d'*Aspergillus*. Pour la première fois, nous disposons donc d'un système permettant une identification aisée de ces espèces. L'ensemble des centres se servant de l'application donne également lieu à la formation d'un important réseau d'utilisateurs. La collaboration multicentrique et prospective avec ce réseau constitue donc un avantage indéniable pour l'établissement d'une collection importante d'isolats. En parallèle, la mise en place de techniques de référence pour l'identification et pour les tests de sensibilité aux antifongiques, permet l'obtention de données fiables. Ceci représente donc une opportunité unique pour la réalisation d'une étude combinant l'analyse épidémiologique, clinique et microbiologique des espèces cryptiques d'*Aspergillus*, avec pour finalité l'enrichissement des connaissances sur ces « nouvelles » espèces cryptiques et l'amélioration de la prise en charge des patients y étant confrontés.

Contexte scientifique

1. Le genre *Aspergillus*

1.1. Définition

Le genre *Aspergillus*, décrit pour la première fois par Micheli en 1729, est l'un des plus anciens noms de genre donné à un champignon (1). Il fait partie, selon la classification systématique du vivant, du règne des Fungi, du phylum des Ascomycota, de l'ordre des Eurotiales, et de la famille des Aspergillaceae (2). Il regroupe un ensemble de champignons filamenteux (appelés aussi moisissures) ayant comme principale caractéristique microscopique commune l'organisation en « tête aspergillaire » de leur organe de reproduction asexuée. C'est la structure de cette « tête aspergillaire », rappelant l'*aspergillum* (goupillon en français) utilisé par l'Eglise catholique pour asperger d'eau bénite les croyants durant la cérémonie de l'*Aspergès*, qui lui a donné son nom (3) (Figure 1).

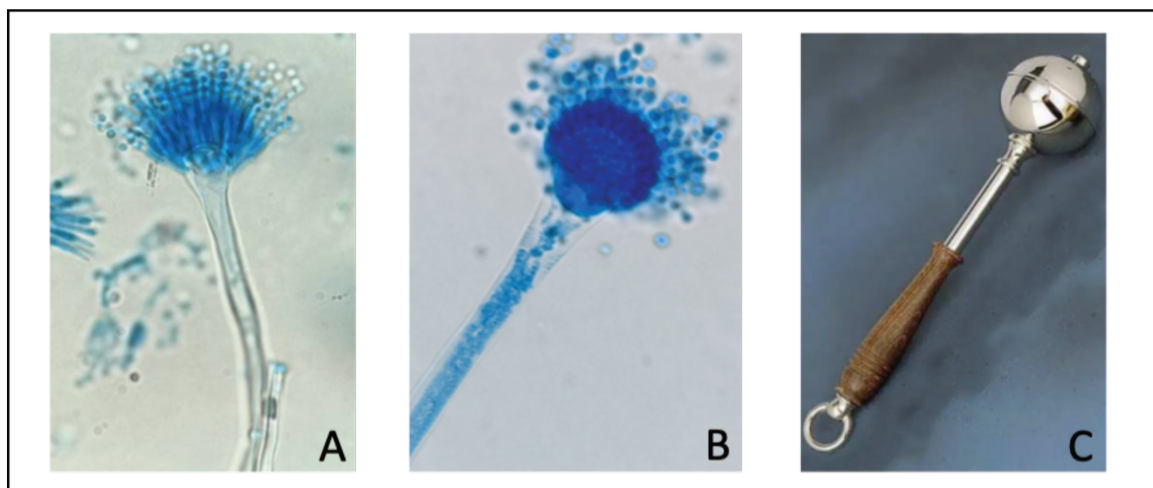


Figure 1 : Examen microscopique d'*A. terreus* (A) et d'*A. fumigatus* (B) ; *aspergillum* (C)

1.2. Habitat – cycle biologique

Les *Aspergillus* sont des champignons ubiquitaires, cosmopolites et saprophytes. Ils se développent dans l'environnement, sous la forme de filaments mycéliens (ou hyphes) septés hyalins, sur des matières organiques dont ils participent grandement à la décomposition aérobie. Ces hyphes représentent la forme végétative du champignon tandis que la

reproduction peut s'effectuer de 2 manières : une reproduction asexuée et une reproduction sexuée.

La reproduction asexuée va s'effectuer par la différenciation d'une cellule du filament en cellule conidiogène, sous l'influence de différents facteurs environnementaux et génétiques (4). A partir de cette cellule, aussi appelée *foot cell*, un conidiophore, porteur à son extrémité d'une « tête aspergillaire », va émerger. Chaque « tête aspergillaire » est composée d'une vésicule sur laquelle prennent naissance plusieurs phialides, qui vont ensuite produire plusieurs centaines de spores asexuées ou conidies (Figure 2).

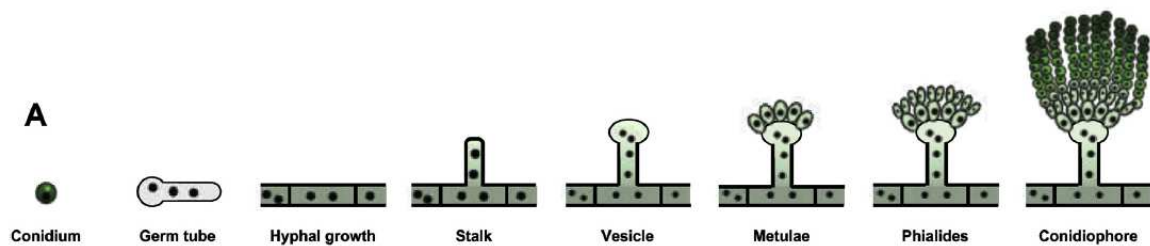


Figure 2 : Cycle de développement des champignons du genre *Aspergillus* à partir d'une conidie (d'après Ojeda-Lopez et al., *Stud Mycol*, 2018)

Cette structure en « tête aspergillaire » correspond donc à l'organe de reproduction asexuée ou forme anamorphe du champignon (Figure 3).

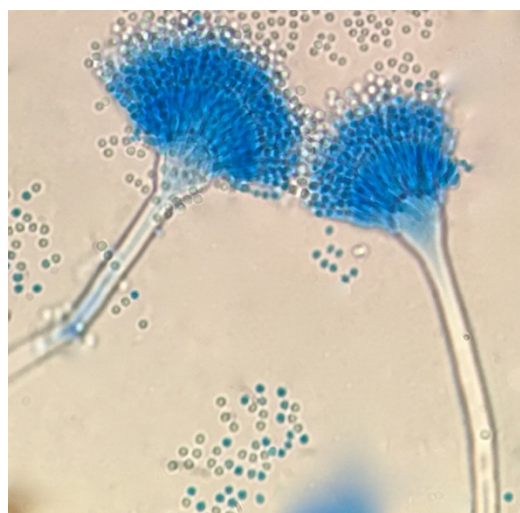


Figure 3 : « Têtes aspergillaires » d'*Aspergillus terreus* produisant des conidies (examen microscopique x400)

Les nombreuses conidies produites vont se détacher facilement des phialides et rester en suspension dans l'air pendant plusieurs heures, étant ainsi transportées au gré des courants. Ceci va permettre la dissémination du champignon par voie aérienne et la colonisation des nouveaux environnements. La concentration aérienne moyenne en conidies atteint 0,2 à 15 conidies/m³ d'air mais peut aller jusqu'à 10⁶ conidies/m³ selon les endroits (proximité de compost, zones de travaux,...) (5).

Ces conidies dormantes métaboliquement inactives, peuvent rester viables pendant plusieurs mois. En cas de conditions favorables, elles vont gonfler, puis émettre un tube germinatif qui va s'allonger pour former de nouveaux filaments mycéliens et décomposer de nouveaux substrats (6).

A l'inverse de la reproduction asexuée, la reproduction sexuée n'a pas été mise en évidence pour toutes les espèces d'*Aspergillus*. En effet, elle a été décrite pour moins de 50% des espèces. Quand elle a lieu, elle aboutit à la formation de spores sexuées ou ascospores qui sont regroupées par 8 au sein d'un asque (7). Ces asques sont eux-mêmes regroupées par milliers au sein d'un cléistothèce, qui correspond à l'organe de reproduction sexuée ou forme téléomorphe. A maturité, le cléistothèce se rompt et libère de manière passive les ascospores (Figure 4). Ce mode de reproduction permet un brassage génétique qui n'est pas possible lors de la reproduction asexuée.

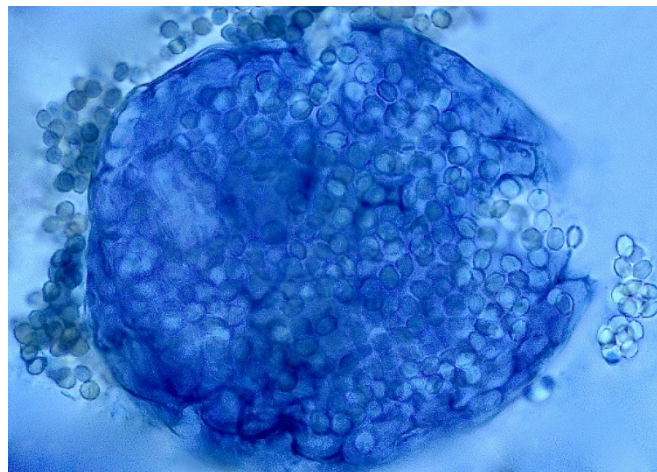


Figure 4 : Cléistothèce d'*Aspergillus montevidensis* libérant des ascospores (examen microscopique x400)

Contrairement à la forme anamorphe qui présente une structure relativement conservée entre les différentes espèces (la tête aspergillaire), il existe une diversité de formes téléomorphes (les cléistothèces) chez les *Aspergillus*, avec au moins 11 formes différentes décrites (7).

1.3. Place du genre *Aspergillus* dans l'environnement

Les champignons du genre *Aspergillus* présentent une grande importance pour l'environnement avec lequel ils interagissent, notamment pour l'homme, et sont une illustration parfaite du concept « *One Health* ». En effet, ces champignons saprophytes jouent un rôle majeur dans le cycle de l'azote et du carbone dans leur environnement naturel. Certaines espèces sont également utilisées depuis longtemps dans l'industrie agro-alimentaire. Citons *A. oryzae* pour la production de saké ou *A. sojae* pour la production de sauce soja. D'autres espèces sont utilisées dans le domaine des biotechnologies : *A. niger* est utilisé pour la production de nombreux composés chimiques dont l'acide citrique, *A. terreus* est utilisé pour produire de l'acide itaconique et de la lovastatine, un hypocholestérolémiant utilisé tel quel ou comme précurseur d'hémisynthèse des autres statines. *Aspergillus nidulans* a quant à lui servi de modèle de biologie cellulaire et produit toujours un précurseur nécessaire à l'hémisynthèse de l'anidulafungine, un antifongique de la classe des échinocandines (8–10).

Cependant, ces mêmes champignons peuvent aussi présenter un rôle délétère et se comporter en pathogènes pour l'Homme, les animaux ou les plantes. Ainsi, *A. sydowii* est impliqué dans la destruction de coraux aux Antilles, tandis que de nombreux cas d'aspergilloses aviaires à *A. fumigatus* sont rapportés (11). *A. flavus* est considéré comme une véritable « peste agricole » entraînant la destruction de nombreuses récoltes en raison de leur contamination par l'aflatoxine, un composé du métabolisme normal de cette espèce, carcinogène pour le foie. Enfin, chez l'homme les champignons du genre *Aspergillus* sont responsables de tout un ensemble de pathologies, allant d'infections superficielles bénignes à des infections invasives dont la mortalité à 3 mois peut dépasser 50%, chez les patients les plus immunodéprimés (cf infra).

1.4. Le concept d'espèce au sein du genre *Aspergillus*

L'espèce représente l'unité de base de la classification taxonomique du vivant. Elle a été généralisée par Linné en 1753, avec l'introduction de la nomenclature binomiale latine, composée d'un nom générique suivi d'une épithète spécifique, et qui est encore utilisée à ce jour (12).

Cependant, la définition d'une espèce au sein du genre *Aspergillus* n'est pas aisée. En effet, depuis les travaux d'Ernst Mayr en 1942, plusieurs concepts définissant la notion d'espèce au

sein du monde du vivant ont été proposés (13). Parmi eux, 3 principaux concepts ont émergé : l'espèce biologique, l'espèce morphologique et l'espèce phylogénétique (14).

Le concept d'espèce biologique définit l'espèce comme un ensemble d'individus interféconds pouvant engendrer une progéniture viable et féconde à son tour. C'est une définition de l'espèce très utilisée par les évolutionnistes et facilement applicable à l'embranchement des Vertébrés. Cependant, elle est difficilement applicable au reste du monde du vivant, où différents modes de reproduction peuvent exister. Ainsi, au sein du règne des champignons, cette définition ne peut s'appliquer qu'aux espèces présentant une reproduction sexuée sur le mode hétérothallique, mettant en jeu 2 individus physiologiquement différents. Or, au sein du genre *Aspergillus*, la plupart des espèces se reproduisent de manière sexuée sur un mode homothallique, à partir d'un même individu auto-fertile. Le concept d'espèce biologique n'est donc pas applicable à la définition d'espèce au sein du genre *Aspergillus* (15).

Le concept d'espèce morphologique a quant à lui été grandement utilisé jusque très récemment, pour la description des espèces au sein du genre *Aspergillus*. En effet, il a servi de base pour le code de nomenclature botanique, auquel était rattaché le règne des champignons, de son introduction par Linné en 1753 jusqu'en 2011 (12, 16). L'espèce morphologique (ou phénotypique) regroupe un ensemble d'individus partageant les mêmes caractéristiques morphologiques et physiologiques, observables macroscopiquement et microscopiquement. Le premier nom d'espèce donné au sein du genre *Aspergillus* en 1809 par Link, est *A. glaucus*, qui correspond à l'espèce type du genre *Aspergillus* (17). Basées sur leurs caractéristiques morphologiques, de nombreuses autres espèces ont ensuite été décrites, selon le code de nomenclature botanique. Parmi ces critères, on retrouve les caractères cultureux macroscopiques (aspect de la colonie, durée et température de croissance), et les caractéristiques microscopiques dont l'aspect de la tête aspergillaire (forme anamorphe), des spores et de la reproduction sexuée (forme téléomorphe). *A. fumigatus*, une des espèces les plus fréquentes a ainsi été décrite pour la première fois en 1863 par Fresenius (18).

Cependant, la description des espèces au sein du genre *Aspergillus*, basée uniquement sur le concept d'espèce morphologique, a abouti à plusieurs confusions taxonomiques.

En premier lieu, les espèces présentant une forme sexuée et une forme asexuée mais décrites à différents moments par des scientifiques différents se sont vues - logiquement - attribuer des noms différents : un pour leur forme anamorphe (*Aspergillus*) et un pour leur forme

téléomorphe. Ainsi, 11 noms de genre téléomorphe (*Eurotium*, *Chaetosartorya*, *Emericella*, *Fennellia*, *Hemicarpenales*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Sclerocleista*, *Stilbothamnium*, *Neopetromyces*, *Neocarpenales*) étaient attribués au seul anamorphe *Aspergillus*. En 2000, Pitt décrivait 184 espèces d'*Aspergillus* associées à 70 espèces téléomorphes (19). Cependant, au cours des années 2000, les outils de biologie moléculaire et les avancées en termes de phylogénie, ont permis de montrer que les formes anamorphes et téléomorphes de chaque espèce étaient identiques génétiquement. Le concept d'espèce phylogénétique a donc pu être appliqué au genre *Aspergillus*. Il correspond à définir l'espèce comme étant le plus petit groupe monophylétique d'individus partageant un même ancêtre commun.

Ainsi, afin de simplifier la taxonomie et de mettre fin à cette double nomenclature, le concept de « *one fungus = one name* » a été décrété en 2011 (16). Il a donc été décidé de regrouper 9 des 11 genres téléomorphes au sein d'un unique genre et de ne garder comme nom de genre commun que le terme *Aspergillus* (20). Les 2 genres téléomorphes restant (*Sclerocleista* et *Hemicarpenales*) ne faisant désormais plus partie du genre *Aspergillus*, afin de respecter la monophylie du genre *Aspergillus* (21).

La seconde confusion taxonomique liée à l'identification morphologique, a également été révélée suite à l'utilisation du concept d'espèce phylogénétique. En effet, certains isolats identiques morphologiquement, se sont révélés très différents phylogénétiquement, conduisant à leur séparation en espèces distinctes (22). De telles espèces, peu ou pas différenciables morphologiquement de l'espèce *sensu stricto*, mais distinctes d'un point de vue phylogénétique ont ainsi été appelées espèces cryptiques (rappelant leur aspect caché, dissimulé). Un nouveau taxon supra-spécifique a donc été défini dans la classification : la section (ou complexe d'espèces) qui regroupe l'ensemble des espèces cryptiques et l'espèce *sensu stricto* partageant les mêmes caractéristiques morphologiques (23). Par conséquent, le genre *Aspergillus* est désormais divisé en 27 sections. Récemment, la notion de série est également apparue et regroupe au sein d'une section des espèces proches phylogénétiquement (2).

L'utilisation des outils de phylogénie moléculaire a donc révolutionné la taxonomie du genre *Aspergillus*, en redéfinissant la notion d'espèce par l'introduction récente du concept d'espèce cryptique. Ainsi pour une seule espèce morphologique *sensu stricto*, plusieurs dizaines d'espèces cryptiques peuvent lui être associées au sein d'une même section (20). Ceci a contribué à une augmentation drastique de la description de nouvelles espèces ces dernières

années. Cependant, afin de limiter l'impact de la seule phylogénie moléculaire sur la taxonomie du genre *Aspergillus*, une espèce est désormais caractérisée sur une base polyphasique, combinant des éléments phénotypiques, physiologiques, phylogénétiques et écologiques (20).

Bien que le nombre d'espèces soit en constante évolution et qu'il soit difficile de fournir un nombre précis, un des derniers recensements publiés en juin 2020, fait état de 436 espèces réparties en 27 sections (2) (Tableau 1).

Sous genre	Section	Nombre d'espèces	Espèce <i>sensu stricto</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>Aspergillus</i>	32	<i>A. glaucus</i>
	<i>Restricti</i>	22	<i>A. restrictus</i>
<i>Circumdati</i>	<i>Candidi</i>	7	<i>A. candidus</i>
	<i>Circumdati</i>	27	<i>A. ochraceus</i>
	<i>Flavi</i>	35	<i>A. flavus</i>
	<i>Flavipedes</i>	15	<i>A. flavipes</i>
	<i>Janorum</i>	4	<i>A. janus</i>
	<i>Nigri</i>	29	<i>A. niger</i>
	<i>Petersoniorum</i>	4	<i>A. petersonii</i>
	<i>Robusti</i>	1	<i>A. robustus</i>
	<i>Tannerorum</i>	1	<i>A. tanneri</i>
	<i>Terrei</i>	17	<i>A. terreus</i>
<i>Cremeri</i>	<i>Cremeri</i>	17	<i>A. cremeus</i>
<i>Fumigati</i>	<i>Cervini</i>	10	<i>A. cervinus</i>
	<i>Clavati</i>	8	<i>A. clavatus</i>
	<i>Fumigati</i>	59	<i>A. fumigatus</i>
	<i>Vargarum</i>	1	<i>A. cejpji</i>
<i>Nidulantes</i>	<i>Aenei</i>	10	<i>A. aeneus</i>
	<i>Bispori</i>	1	<i>A. bisporus</i>
	<i>Cavernicolarum</i>	5	<i>A. cavernicola</i>
	<i>Nidulantes</i>	74	<i>A. nidulans</i>
	<i>Ochraceorosei</i>	3	<i>A. ochraceoroseus</i>
	<i>Raperorum</i>	2	<i>A. raperi</i>
	<i>Silvatici</i>	1	<i>A. silvaticus</i>
	<i>Sparsi</i>	9	<i>A. sparsus</i>
	<i>Usti</i>	25	<i>A. ustus</i>
<i>Polypaecilum</i>	<i>Polypaecilum</i>	16	<i>A. insolitus</i>

Tableau 1 : Classification du genre *Aspergillus*, nombre d'espèces par section et espèce *sensu stricto* de chaque section (d'après Houbraken et al., *Stud Mycol*, 2020)

2. Outils d'identification des espèces au sein du genre *Aspergillus*

L'identification précise des espèces au sein du genre *Aspergillus* reste un défi, même pour des mycologues aguerris. En effet, les caractéristiques physiologiques et morphologiques, qui sont restées pendant de nombreuses années les clés de l'identification, ne sont plus adaptées à la définition actuelle de l'espèce. Des outils de biologie moléculaire ont depuis été développés et sont désormais considérés comme la référence pour identifier précisément une espèce au sein du genre *Aspergillus*. Cependant, ils nécessitent des compétences particulières et leur accès reste restreint aux centres experts. En parallèle, la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*), s'est démocratisée pour l'identification des microorganismes et représente une alternative intéressante aux méthodes de référence pour une identification précise, fiable et facile à mettre en œuvre, des espèces au sein du genre *Aspergillus*.

2.1. Identification morphologique

L'identification morphologique repose sur l'observation des caractères culturaux, macroscopiques et microscopiques de l'isolat. La température, le temps de croissance, la couleur et la taille de la colonie, en fonction du milieu de culture choisi, sont des éléments importants pour l'identification. Les caractéristiques microscopiques reposent sur l'observation des structures de reproduction asexuée (conidiophores et têtes aspergillaires) et sexuée (cléistothèces), ainsi que sur l'aspect des spores produites (conidies et ascospores), lorsqu'elles sont présentes. Ces éléments microscopiques peuvent s'observer par la « technique du drapeau », consistant à venir apposer un bout de ruban adhésif transparent sur la colonie, puis en venant le déposer sur une lame en présence d'un agent éclaircissant (bleu de lactophénol par exemple). Ainsi, la forme de la vésicule, l'implantation des phialides sur la vésicule (radiées ou en colonne), intercalées ou non par une rangée de métules, mais aussi la taille, la couleur, l'aspect lisse ou rugueux et la forme du conidiophore pourront être observés (Figure 5).

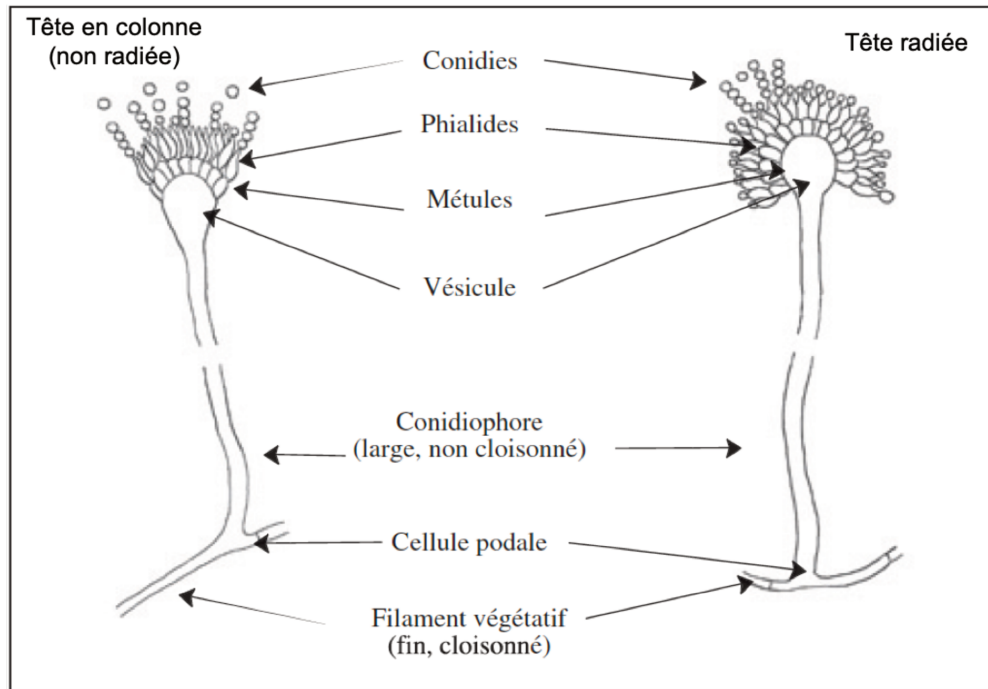


Figure 5 : Caractéristiques microscopiques des « Têtes aspergillaires »

Les caractéristiques morphologiques des principales sections rencontrées historiquement en pathologie humaine sont présentées dans le Tableau 2.

Section	Physiologie	Macroscopie	Microscopie		Autres éléments
			Conidiophore	Vésicule	
<i>Fumigati</i>	Croissance rapide à 37°C, croissance jusqu'à 56°C	Colonie gris-vert	Lisse Taille moyenne	Evasée En colonne Unisériée	
<i>Flavi</i>	Croissance rapide à 37°C	Colonie jaune-vert	Echinulé Long	Sphérique Polymorphe selon le stade En colonne ou radiée, uni ou bisériée	Conidies globuleuses
<i>Nigri</i>	Croissance rapide à 37°C	Colonie noire	Lisse Très long (> 1 mm)	Sphérique Radiée Bisériée	
<i>Terrei</i>	Croissance rapide à 37°C	Colonie beige, brun cannelle	Lisse Taille moyenne	Sphérique En colonne Bisériée	
<i>Nidulantes</i>	Croissance optimale à 30°C	Colonie verte	Lisse, pigmenté Très court, coudé à la base (<i>footcell</i>)	Sphérique En colonne Bisériée	Présence de cellules de Hülle

Tableau 2 : Caractéristiques morphologiques des principales sections rencontrées en pathologie humaine

Bien que facile à mettre en œuvre, peu coûteuse et ne nécessitant que très peu de matériel, l'identification morphologique ne permet pas la distinction des différentes espèces cryptiques entre elles. Elle permet donc, au mieux, une identification au niveau de la section et le résultat doit être rendu en conséquence. Ainsi, l'identification d'un isolat d'*A. fumigatus* identifié morphologiquement uniquement devrait être désormais rendue « *Aspergillus* section *Fumigati* » ou « *A. fumigatus sensu lato* ». De plus, certains critères morphologiques restent assez flous et hautement subjectifs (par exemple la couleur de la colonie de *A. nidulans* est décrite comme verte, beige chamois ou jaune miel) (24), et la qualité d'identification dépendra donc de l'expérience du mycologue. Enfin, certains isolats et certaines espèces d'*Aspergillus* demeurent stériles en culture, et ne produisent pas ou peu de « tête aspergillaire », rendant l'identification de l'espèce, voire même du genre *Aspergillus*, quasi impossible. Pour ces raisons, les outils morphologiques ne sont plus adaptés pour obtenir une identification précise d'une espèce, notamment cryptique.

2.2. Identification moléculaire

Actuellement, l'identification moléculaire représente la méthode de référence pour la reconnaissance d'une espèce cryptique au sein d'une section (20). Elle repose sur le séquençage de certaines régions d'acide désoxyribonucléique (ADN) conservées au sein du genre *Aspergillus* mais présentant un certain degré de variabilité entre les différentes espèces. Les séquences nucléotidiques obtenues sont comparées aux séquences de référence de chaque espèce. Celle présentant la meilleure correspondance nucléotidique avec la séquence de l'isolat à identifier donnera ainsi l'espèce à laquelle il appartient.

Les régions intra-géniques transcrites, communément appelées ITS (*internal transcribed spacers*) du gène codant pour l'ARN ribosomique sont parmi les plus utilisées pour l'identification moléculaire des champignons. Pour le genre *Aspergillus*, le séquençage des régions ITS n'est généralement pas suffisamment discriminant pour identifier une espèce cryptique et ne permet qu'un rendu de résultat au niveau de la section, tout comme l'identification morphologique. D'autres régions de l'ADN sont donc utilisées, notamment une partie du gène *cmd* codant pour la calmoduline, une partie du gène *benA* codant pour la β -tubuline ou une partie du gène *rpb2* codant pour l'ARN polymérase II (20).

La comparaison des séquences obtenues avec les séquences de référence peut s'effectuer de plusieurs manières. Il est possible de comparer les séquences avec celles présentes sur les bases de données en ligne. Parmi celles-ci, Genbank, développée par le *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), présente l'avantage d'être une banque généraliste en accès libre comprenant l'ensemble des séquences nucléotidiques publiques disponibles. Cependant les séquences y étant déposées librement par les utilisateurs, leur assignation correcte (notamment au niveau du nom de l'espèce) n'est pas vérifiée, et certaines erreurs peuvent s'y glisser. Il existe également des bases de données spécifiques, notamment la base Mycobank, proposée par l'*International Mycological Association* (IMA) (<https://www.mycobank.org>) ou la base *Aspergillus* et *Penicillium* du *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* (ex CBS-KNAW) (<http://www.westerdijkinstitut.nl/aspergillus>). Ces deux bases en accès libre et rattachées à des centres de référence en mycologie, présentent l'intérêt d'une vérification des séquences et de leurs assignations au moment du dépôt. En conséquence, elles sont moins riches en termes de séquences que la base Genbank.

Plusieurs outils bio-informatiques sont proposés par les bases de données afin de trouver la séquence présentant le plus de similitudes avec la séquence à identifier. Le NCBI propose ainsi l'outil *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) qui est une méthode heuristique qui fournit un score d'alignement avec toutes les séquences présentes dans Genbank (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Mycobank et le *Westerdijk Fungal Biodiversity Institute* proposent un outil de comparaison de séquences deux à deux (*pairwise comparison*), tout en laissant le choix de la base de données à interroger. L'utilisation de ces outils ne permet d'identifier qu'une seule séquence à la fois, ce qui s'avère long et fastidieux lorsque de nombreux isolats sont à identifier, d'autant plus si plusieurs gènes sont testés pour un isolat donné. En outre, dans certains cas plusieurs résultats d'identification avec le même degré de certitude peuvent être rendus par ces outils pour une seule et même séquence à identifier. En effet, pour certaines espèces les séquences des gènes *benA*, *cmd* ou *rpb2*, prises chacune de leur côté, ne sont pas assez discriminantes et peuvent être identiques pour deux espèces proches. De la même manière, l'analyse isolée des séquences de ces différents gènes peut amener à des résultats d'identification discordants pour certaines espèces. Il est donc nécessaire de combiner l'analyse de plusieurs gènes. Ces outils ne sont donc pas les plus adaptés pour obtenir l'identification la plus précise possible pour de telles espèces.

La deuxième méthode permettant la comparaison des séquences à identifier avec les séquences de référence, consiste à construire des arbres phylogénétiques qui permettent de modéliser l'histoire évolutive d'un groupe d'organismes. L'analyse des relations entre les séquences à identifier et celles de référence permettra ainsi d'obtenir une identification d'espèce précise. Plusieurs logiciels dédiés à l'analyse phylogénétique existent (par exemple MEGA ou Seaview). Le choix des modèles d'évolution ainsi que des méthodes d'inférence phylogénétique (méthodes de distance ou méthodes probabilistes) utilisés dépendra principalement de la précision souhaitée, du nombre de séquences à analyser ainsi que de la puissance de calcul de l'ordinateur (Figure 6).

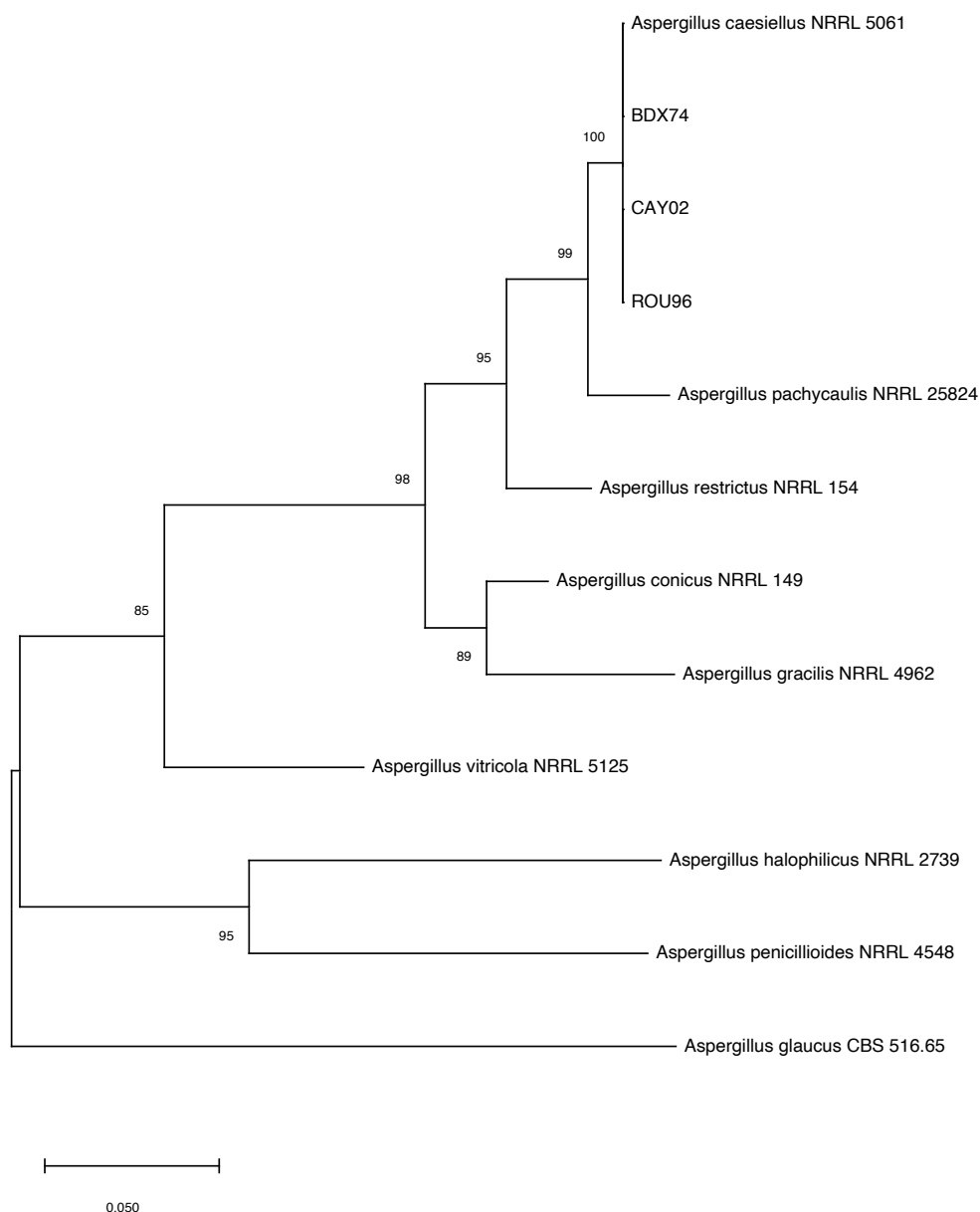


Figure 6 : Exemple d'arbre phylogénétique, construit à partir des séquences de référence du gène *cmd* de la section *Restricti*. Les séquences BDX74, CAY02 et ROU96 apparaissent sur la même ligne qu'*A. caesiellus* et correspondent donc à cette espèce

Un des principaux avantages de l'analyse phylogénétique est la possibilité d'inclure dans une seule analyse toutes les séquences à identifier ainsi que toutes les séquences de référence. Il est également possible d'évaluer les relations pour plusieurs gènes en concaténant (c'est à dire en aboutant) les séquences obtenues. Ceci permet de s'affranchir des défauts de résolution des séquences prises séparément (*benA*, *cmd* ou *rpb2*). Les numéros d'accès permettant de récupérer sur Genbank les séquences de référence de ces différents gènes pour l'ensemble des espèces du genre *Aspergillus*, afin de réaliser les analyses phylogénétiques, sont disponibles sur le site www.aspergilluspenicillium.org de l'*International Commission of Penicillium and Aspergillus* (ICPA) ou pour les espèces plus récentes dans la publication de Houbraken et al. (2).

Enfin, en plus de séquencer des parties de quelques gènes, il est désormais possible de séquencer les génomes complets des isolats à identifier et de les comparer à ceux des espèces déjà séquencés. Cependant cette méthode reste limitée pour le moment par le faible nombre de génomes de référence disponibles et par la difficulté pour placer le curseur entre simple polymorphisme génétique au sein d'une espèce et espèce différente.

En dépit des avantages indéniables de l'identification moléculaire pour l'obtention d'une identification précise des espèces cryptiques d'*Aspergillus*, plusieurs facteurs limitent toujours son utilisation à grande échelle. Elle présente un certain coût et nécessite du matériel et des compétences spécifiques, notamment en bio-informatique pour l'analyse phylogénétique ou le séquençage de génome complet. De plus, à la différence de l'identification morphologique, les temps techniques incompressibles ne permettent généralement pas un rendu rapide du résultat. Enfin, il faut être prudent lors de l'utilisation des outils de comparaison des séquences sur les bases de données et être au courant de leurs avantages et inconvénients spécifiques. L'identification moléculaire relève donc pour le moment principalement du laboratoire spécialisé.

2.3. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

L'utilisation de la spectrométrie de masse de type MALDI-TOF a révolutionné l'identification en routine des microorganismes (25). C'est particulièrement vrai pour l'identification des bactéries et des levures, où elle s'est démocratisée ces dernières années,

mais elle est également applicable pour l'identification des champignons filamenteux, dont les *Aspergillus* (26, 27).

L'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF repose sur l'acquisition d'un spectre de masses peptidiques/protéiques caractéristique du microorganisme à identifier. Pour cela, l'échantillon à analyser est mêlé à une matrice avec laquelle il co-cristallise sur une plaque. Sous l'impulsion d'un laser et grâce à l'action de la matrice qui va absorber l'énergie, l'échantillon est vaporisé et ionisé (technologie MALDI). Ces protéines ionisées sont ensuite mises en mouvement sous l'action d'un champ électrique, et séparées dans un tube à temps de vol en fonction de leur rapport m/z (m correspondant à la masse moléculaire et z correspondant à la charge), avant de passer devant un détecteur (analyseur TOF). Plus ce rapport m/z sera élevé, plus le temps de vol sera long (28) (Figure 7).

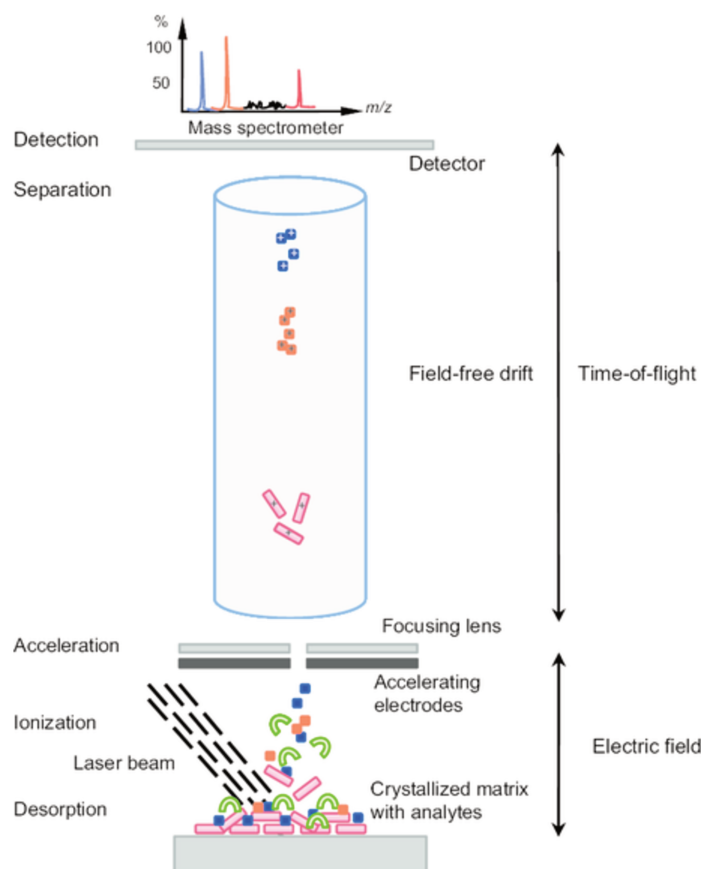


Figure 7 : Principe de la spectrométrie de masse (d'après Lavigne et al., *Clin Chem Lab Med*, 2013)

La somme des protéines ionisées analysées va former un spectre caractéristique de l'échantillon. Il est généralement représenté sous la forme d'un graphique avec en abscisses le rapport m/z et en ordonnées l'intensité relative du signal et où les pics représentent les protéines ionisées. La fenêtre de masses protéiques acquises est généralement comprise entre 2000 et 20000 daltons (Figure 8).

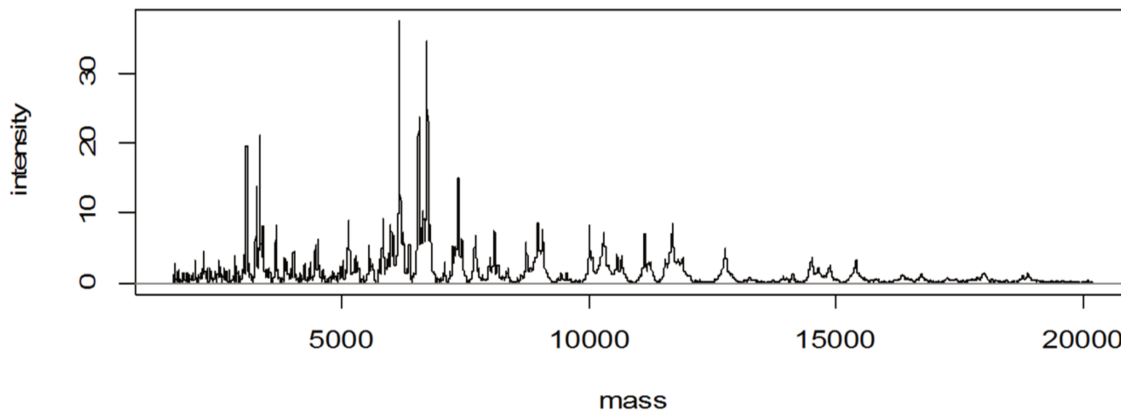


Figure 8 : Exemple d'un spectre de masse obtenu par MALDI-TOF

Ce spectre ainsi obtenu est comparé avec une ou plusieurs banques de spectres de référence, selon différents algorithmes en fonction du système utilisé. Celui présentant la meilleure correspondance avec le spectre de l'isolat à identifier donnera l'espèce à laquelle il appartient. La qualité de la banque de spectres de référence est un élément primordial pour la qualité d'identification du microorganisme.

L'identification par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF présente le double intérêt d'être une technique facilement réalisable en routine et de fournir une identification précise, rapide et à moindre coût (hors coût de l'automate). Pour les champignons filamenteux, elle présente également l'intérêt de permettre une identification avant l'apparition des fructifications, ce qui n'est pas possible avec l'identification morphologique. Cependant, jusqu'à très récemment, son application pour l'identification des champignons filamenteux, dont les *Aspergillus*, était limitée par le faible nombre de références de champignons filamenteux incluses dans les bases de données fournies avec les spectromètres de masse (27). Ainsi les 2 bases de données possédant le marquage européen pour le diagnostic *in vitro* (CE-IVD), Vitek MS v3 pour Biomérieux® et MALDI Bio-Typer (MBT) pour Bruker®, ne contiennent respectivement que douze et zéro références d'espèces différentes d'*Aspergillus*.

Afin d'améliorer les performances d'identification des champignons filamenteux plusieurs bases de données ont été développées et sont dorénavant disponibles. La société Bruker® a ainsi produit une extension *research use only* (RUO) de sa base de données (MBT *Filamentous Fungi Library* 3.0), composée de 180 références de champignons filamenteux dont 30 espèces d'*Aspergillus* différentes (Tableau 3).

Section	Espèce	Section	Espèce
Flavi (n=5)	<i>Aspergillus flavus_oryzae_group</i>	Nigri (n=3)	<i>Aspergillus brasiliensis</i>
	<i>Aspergillus minisclerotigenes</i>		<i>Aspergillus japonicus</i>
	<i>Aspergillus nomius</i>		<i>Aspergillus niger</i>
	<i>Aspergillus parasiticus</i>	Circumdati (n=3)	<i>Aspergillus ochraceus</i>
	<i>Aspergillus tamarii</i>		<i>Aspergillus sclerotiorum</i>
Nidulantes (n=4)	<i>Aspergillus nidulans</i>	Usti (n=2)	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>
	<i>Aspergillus sydowii</i>		<i>Aspergillus calidoustus</i>
	<i>Aspergillus unguis</i>	Terrei (n=1)	<i>Aspergillus ustus</i>
	<i>Aspergillus versicolor</i>		<i>Aspergillus terreus</i>
Aspergillus (n=4)	<i>Aspergillus glaucus</i>	Clavati (n=1)	<i>Aspergillus clavatus</i>
	<i>Aspergillus montevidensis</i>	Cremeri (n=1)	<i>Aspergillus pulvinus</i>
	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>	Candidi (n=1)	<i>Aspergillus tritici</i>
	<i>Aspergillus ruber</i>	Flavipedes (n=1)	<i>Aspergillus iizukae</i>
Fumigati (n=2)	<i>Aspergillus fumigatus</i>	Restricti (n=1)	<i>Aspergillus penicillioides</i>
	<i>Aspergillus lentulus</i>	Inconnue (n=1)	<i>Aspergillus sp</i>

Tableau 3 : Liste des espèces réparties par sections, présentes sur la base *Filamentous Fungi Library* version 3.0 de Bruker

L'acquisition des spectres et l'analyse étant indépendantes, il est également possible de constituer sa propre base de données à partir des spectres de masse acquis sur un des automates commercialisés. Ainsi l'application indépendante MSI est la plus importante base de données de spectres de masse pour les champignons filamenteux. Elle a été construite en collaboration avec la collection du BCCM/IHEM, à partir de spectres acquis avec un MALDI-TOF de type Bruker®, et est composée de 1088 références de champignons filamenteux dont 162 *Aspergillus* différents (Tableau 4). La première version de l'application est disponible en ligne gratuitement (<https://biological-mass-spectrometry-identification.com>) depuis le 01/08/2017 et propose de télécharger les spectres bruts acquis avec un MALDI-TOF Bruker® pour les analyser selon un algorithme différent de celui du constructeur. Elle a depuis été remplacée par la version 2 (<https://msi.happy-dev.fr>). D'autres bases de données indépendantes ont également pu être construites par des utilisateurs de spectromètre de masse. Cependant, à la différence de l'application MSI qui propose aussi une base de données pour

l'identification des parasites du genre *Leishmania* et des diptères, elles ne sont généralement pas ouvertes à tous.

Bien que les bases de données soient encore incomplètes et en constante amélioration, la spectrométrie de masse MALDI-TOF est devenue une alternative crédible à l'identification moléculaire, pour l'identification précise et rapide des espèces cryptiques au sein du genre *Aspergillus*.

Section	Espèce	Section	Espèce	Section	Espèce
Nidulantes (n=30)	<i>Aspergillus cf.spelunceus</i>	Nigri (n=20)	<i>Aspergillus aculeatinus</i>	Terrei (n=11)	<i>Aspergillus alabamensis</i>
	<i>Aspergillus amoenus</i>		<i>Aspergillus aculeatus</i>		<i>Aspergillus allahabadii</i>
	<i>Aspergillus astellatus</i>		<i>Aspergillus brasiliensis</i>		<i>Aspergillus aureoterreus</i>
	<i>Aspergillus aureolatus</i>		<i>Aspergillus brunneoviolaceus</i>		<i>Aspergillus carneus</i>
	<i>Aspergillus austroafricanus</i>		<i>Aspergillus carbonarius</i>		<i>Aspergillus citrinoterreus</i>
	<i>Aspergillus caespitosus</i>		<i>Aspergillus cf.tubingensis</i>		<i>Aspergillus floccosus</i>
	<i>Aspergillus cf.spelunceus</i>		<i>Aspergillus ellipticus</i>		<i>Aspergillus hortai</i>
	<i>Aspergillus creber</i>		<i>Aspergillus floridensis</i>		<i>Aspergillus microcysticus</i>
	<i>Aspergillus delacroxii</i>		<i>Aspergillus heteromorphus</i>		<i>Aspergillus neoindicus</i>
	<i>Aspergillus desertorum</i>		<i>Aspergillus ibericus</i>		<i>Aspergillus niveus</i>
	<i>Aspergillus echinulatus</i>		<i>Aspergillus japonicus</i>		<i>Aspergillus terreus</i>
	<i>Aspergillus griseoaurantiacus</i>		<i>Aspergillus luchuensis</i>	Circumdati (n=10)	<i>Aspergillus affinis</i>
	<i>Aspergillus jensenii</i>		<i>Aspergillus neoniger</i>		<i>Aspergillus auricomus</i>
	<i>Aspergillus nidulans</i>		<i>Aspergillus niger</i>		<i>Aspergillus insulicola</i>
	<i>Aspergillus protuberus</i>		<i>Aspergillus piperis</i>		<i>Aspergillus melleus</i>
	<i>Aspergillus puulaauensis</i>		<i>Aspergillus pulverulentus</i>		<i>Aspergillus ochraceopetaliformis</i>
	<i>Aspergillus quadrilineatus</i>	<i>Aspergillus tubingensis</i>	<i>Aspergillus ochraceus</i>		
	<i>Aspergillus rugulosus</i>	<i>Aspergillus uvarum</i>	<i>Aspergillus ostianus</i>		
	<i>Aspergillus rugulovalvus</i>	<i>Aspergillus vadensis</i>	<i>Aspergillus persii</i>		
	<i>Aspergillus spelunceus</i>	<i>Aspergillus welwitschiae</i>	<i>Aspergillus sclerotiorum</i>		
	<i>Aspergillus spinulosporus</i>	Flavi (n=16)	<i>Aspergillus westerdijkiae</i>		
	<i>Aspergillus stella-maris</i>		<i>Aspergillus alliaceus</i>	Usti (n=7)	<i>Aspergillus calidoustus</i>
	<i>Aspergillus stellatus</i>		<i>Aspergillus avenaceus</i>		<i>Aspergillus heterothallicus</i>
	<i>Aspergillus striatus</i>		<i>Aspergillus bombycis</i>		<i>Aspergillus insuetus</i>
	<i>Aspergillus sydowii</i>		<i>Aspergillus caelatus</i>		<i>Aspergillus pseudodfectus</i>
	<i>Aspergillus tabacinus</i>		<i>Aspergillus coremiiformis</i>		<i>Aspergillus pseudoustus</i>
	<i>Aspergillus unguis</i>		<i>Aspergillus flavofurcatus</i>		<i>Aspergillus puniceus</i>
	<i>Aspergillus varicolor</i>		<i>Aspergillus flavus</i>		<i>Aspergillus ustus</i>
	<i>Aspergillus versicolor</i>		<i>Aspergillus leporis</i>	Flavipedes (n=7)	<i>Aspergillus ardalensis</i>
	<i>Emericella desertorum</i>		<i>Aspergillus nomius</i>		<i>Aspergillus flavipes</i>
Fumigati (n=22)	Aspergillus (n=14)		<i>Aspergillus parasiticus</i>		<i>Aspergillus izukae</i>
			<i>Aspergillus parvisclerotigenus</i>		<i>Aspergillus calidoustus</i>
			<i>Aspergillus pseudonomius</i>		<i>Aspergillus mangaliensis</i>
			<i>Aspergillus subolivaceus</i>	<i>Aspergillus micronesiensis</i>	
			<i>Aspergillus tamarii</i>	<i>Aspergillus spelaeus</i>	
			<i>Aspergillus terricola</i>	<i>Aspergillus templicola</i>	
		<i>Aspergillus thomii</i>	Cremei (n=6)	<i>Aspergillus dimorphicus</i>	
		<i>Aspergillus athecicus</i>		<i>Aspergillus europaeus</i>	
		<i>Aspergillus cf.xerophilus</i>		<i>Aspergillus flaschentraegeri</i>	
		<i>Aspergillus chevalieri</i>		<i>Aspergillus itaconicus</i>	
		<i>Aspergillus cristatus</i>		<i>Aspergillus stromatoides</i>	
		<i>Aspergillus glaucus</i>		<i>Aspergillus wentii</i>	
		<i>Aspergillus heterocaryoticus</i>	Restricti (n=6)	<i>Aspergillus caesiellus</i>	
		<i>Aspergillus hollandicus</i>		<i>Aspergillus cf.restrictus</i>	
	<i>Aspergillus intermedius</i>	<i>Aspergillus conicus</i>			
	<i>Aspergillus montevidensis</i>	<i>Aspergillus halophilicus</i>			
	<i>Aspergillus proliferans</i>	Clavati (n=3)	<i>Aspergillus penicillioides</i>		
	<i>Aspergillus pseudoglaucus</i>		<i>Aspergillus restrictus</i>		
	<i>Aspergillus rubrobrunneus</i>		<i>Aspergillus clavatus</i>		
	<i>Aspergillus xerophilus-cf Eurotium minus</i>	Cavernicularum (n=2)	<i>Aspergillus giganteus</i>		
	<i>Aspergillus amylovorus</i>		<i>Aspergillus rhizopodus</i>		
	Aeni (n=2)	Cervini (n=1)	<i>Aspergillus cavernicola</i>	Polypaecilum (n=1)	<i>Aspergillus caninus</i>
<i>Aspergillus aeneus</i>			Inconnue (n=1)	<i>Aspergillus sp.</i>	
<i>Aspergillus eburneocremeus</i>	Candidi (n=3)	<i>Aspergillus cervinus</i>	Ex-Aspergillus (n=3)	<i>Aspergillus clavatoflavus</i>	
Sparsi (n=1)		<i>Aspergillus candidus</i>		<i>Aspergillus spinulosus</i>	
		<i>Aspergillus sparsus</i>		<i>Aspergillus subalbidus</i>	<i>Aspergillus citrosporus</i>
Petersoniorum (n=1)		<i>Aspergillus tritici</i>			

Tableau 4 : Liste des espèces réparties par sections, présentes sur la base MSI 1

3. Pouvoir pathogène des champignons du genre *Aspergillus* chez l'Homme

3.1. Généralités

Du fait de la présence importante de champignons du genre *Aspergillus* dans l'environnement, l'Homme y est constamment confronté. L'exposition se fait principalement au niveau du tractus respiratoire par l'inhalation des conidies présentes dans l'air, mais elle peut aussi s'effectuer par contact cutané ou muqueux direct. Cependant, le risque de développer une pathologie aspergillaire, ou aspergillose, reste mince dans la population générale et ne concerne que des patients présentant un terrain particulier (29). Les champignons du genre *Aspergillus* sont des pathogènes opportunistes ne pouvant se développer, malgré certains facteurs de virulence, qu'en présence de facteurs favorisants présents chez l'hôte.

L'Homme a développé des mécanismes de défense efficaces qui lui permettent de ne pas développer de maladie à chaque exposition avec le champignon. L'épithélium cutanéomuqueux et l'anatomie du tractus respiratoire représentent des barrières mécaniques essentielles pour empêcher le champignon de se développer dans l'organisme. Chez l'individu sain, au niveau respiratoire, le tapis muco-ciliaire trachéobronchique permet d'éliminer la plupart des conidies inhalées (30). Les conidies se retrouvent piégées dans le mucus contenant des substances antimicrobiennes et sont évacuées par le mouvement des cils vibratiles (Figure 9).

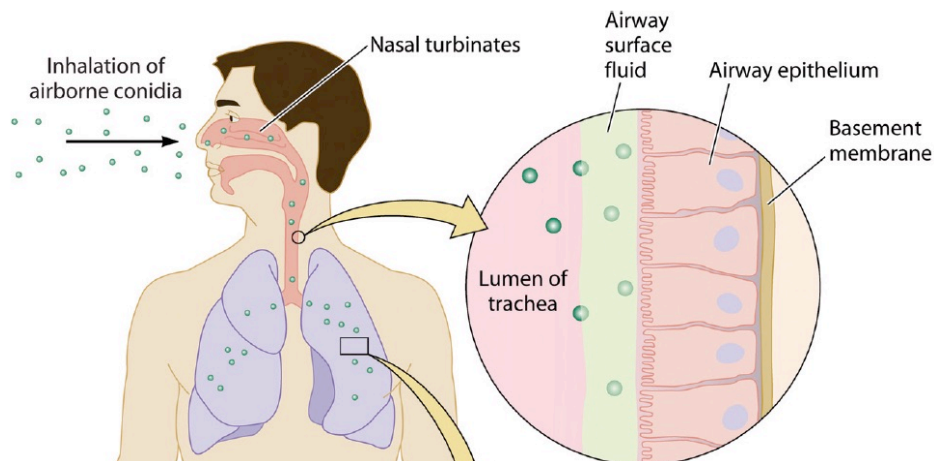


Figure 9 : Représentation schématique du devenir des spores après inhalation (Park et Mehrad, *Clin. Microbiol. Rev.* 2009)

Les cellules épithéliales trachéales et nasales participent elles aussi à l'élimination des conidies par leur capacité à les phagocyter (31). Cependant, du fait de leur petite taille, certaines conidies peuvent passer cette première barrière et atteindre les alvéoles pulmonaires. Les cellules de l'immunité innée vont alors prendre le relais pour compléter la défense anti-aspergillaire. Les principaux effecteurs sont les macrophages résidents des alvéoles pulmonaires qui phagocytent et détruisent les conidies non germées (30, 32, 33).

Chez l'individu sain où seule une faible quantité de conidies parvient au niveau alvéolaire, l'élimination se fait sans déclenchement de réaction inflammatoire. En cas de pénétration d'une grande quantité de conidies, notamment chez les personnes présentant une altération de l'épithélium muco-ciliaire, les macrophages vont sécréter des substances pro-inflammatoires afin de recruter d'autres cellules de l'immunité pour les seconder. Parmi ces cellules, les polynucléaires neutrophiles (PNN) sont des acteurs majeurs de la défense anti-aspergillaire. Ils vont s'attaquer aux conidies gonflées et germées en les phagocytant, mais aussi aux filaments mycéliens, avant leur envahissement des tissus. D'autres cellules de l'immunité comme les cellules *natural killer* (cellules NK) ou les cellules dendritiques participent à cette défense anti-aspergillaire et permettent de faire le lien avec l'immunité adaptative (32).

En cas d'altération de ces défenses mécaniques et/ou immunitaires, l'Homme risque de développer une pathologie aspergillaire. Le premier cas suspecté d'aspergillose humaine a ainsi été décrit en 1791 par Plaignaud (34). Il s'agissait d'un soldat de l'armée française présentant un présumé aspergillome du sinus maxillaire apparu suite à une forte contusion. Après 4 ans d'évolution le patient a été traité par chirurgie et cautérisation au fer rouge et a finalement été guéri après de nombreuses interventions. Depuis, les aspergilloses humaines sont devenues un problème de santé publique : en 2017, il a été estimé que plus de 14 millions de personnes dans le monde souffraient d'une forme d'aspergillose (35).

3.2. Pathologies aspergillaires

L'état des défenses mécaniques et immunitaires d'un individu conditionne sa réponse vis à vis des *Aspergillus*, qui seront responsables d'un large spectre de pathologies. Une atteinte des barrières mécaniques sera potentiellement responsable de formes chroniques et/ou superficielles, mais qui resteront contrôlées par l'immunité générale. Cependant une sollicitation trop importante de ce système immunitaire, ou son dérèglement, entrainera des

réactions d'hypersensibilité vis-à-vis du champignon. A l'inverse, en cas d'altération du système immunitaire, et notamment des macrophages alvéolaires et des PNN, la croissance du champignon ne sera plus contrôlée et il pourra envahir les tissus profonds et sera responsable de formes invasives (30).

La nosologie des aspergilloses est d'autant plus compliquée qu'il existe de nombreuses formes cliniques au sein de chaque catégorie, mais aussi car il existe un continuum entre ces différentes formes ; un patient pouvant présenter successivement l'une ou l'autre de ces aspergilloses.

3.2.1. Colonisation du tractus respiratoire

Un défaut d'épuration de spores d'*Aspergillus* inhalées sera responsable d'une colonisation du tractus respiratoire. Sa définition ne fait pas consensus, mais elle va être évoquée chez des patients chez qui un isolat d'*Aspergillus* est retrouvé en culture d'un prélèvement respiratoire, sans qu'il ne soit associé à une pathologie aspergillaire (36). Cette colonisation peut être transitoire ou chronique et survient dans la plupart des cas chez des patients présentant une pathologie pulmonaire sous-jacente. Bien que la colonisation ne corresponde donc pas à une pathologie aspergillaire en soi, elle n'est pas à négliger. En effet, lorsqu'elle devient chronique, elle apparaît comme une première étape au développement d'autres formes d'aspergillose, comme les aspergilloses pulmonaires chroniques (APC) ou les réactions d'hypersensibilité. De plus, la colonisation aspergillaire apparaît généralement comme un marqueur de mauvaise évolution de la pathologie pulmonaire sous-jacente (37).

La mucoviscidose et la bronchopathie chronique obstructive (BPCO) représentent deux des principales pathologies pour lesquelles le risque de colonisation aspergillaire est important. Ainsi, il est estimé que plus de 50% des patients souffrant de mucoviscidose sont colonisés à *Aspergillus* et que cette colonisation pourrait être associée à un déclin de la fonction respiratoire et à un risque accru d'exacerbation, bien que ces observations soient discutées (38). Chez ces patients, le risque de sensibilisation aspergillaire est également important. Au cours de la BPCO, la colonisation aspergillaire est associée à une aggravation de la fonction respiratoire et est un point de départ pour le développement d'une APC ou d'une sensibilisation aspergillaire (37). Elle pourrait également être un facteur de risque de développer une aspergillose invasive (AI) au cours des exacerbations.

3.2.2. Réactions d'hypersensibilité

Les champignons du genre *Aspergillus* peuvent entraîner des réactions d'hypersensibilité et être responsables de pathologies immuno-allergiques telles que l'aspergillose bronchopulmonaire allergique (ABPA) ou l'exacerbation de crises d'asthme. Suite à une colonisation aspergillaire, la persistance de conidies ou de filaments dans les voies respiratoires peut entraîner une sensibilisation du système immunitaire adaptatif vis-à-vis du champignon, avec un risque de réponse aberrante à chaque nouvelle pénétration du champignon (39).

L'ABPA est la forme la plus sévère des réactions d'hypersensibilité liées aux *Aspergillus* et survient chez 1 à 2% des patients souffrant d'asthme et 1 à 15% des patients atteints de mucoviscidose (40). L'activation permanente du système immunitaire adaptatif entraîne une inflammation constante et une infiltration pulmonaire qui sera responsable à terme de dommages irréversibles avec l'apparition de bronchiectasies centrales. Ces dernières peuvent elles-mêmes être à l'origine d'aspergilloses chroniques.

3.2.3. Aspergilloses chroniques non invasives

Les aspergilloses chroniques comprennent un spectre étendu de pathologies d'évolution supérieure à 3 mois, allant d'une atteinte superficielle bénigne à des atteintes plus profondes de pronostic sombre. Ces pathologies surviennent chez des patients ne présentant pas d'immunodépression générale mais ayant des facteurs de risques locaux. Les atteintes superficielles sont représentées par les otomycoses et les onychomycoses tandis que les atteintes chroniques profondes sont principalement les sinusites aspergillaires et les aspergilloses pulmonaires chroniques (APC).

- **Otomycoses**

Les otites aspergillaires ou otomycoses correspondent à un envahissement superficiel du conduit auditif externe (CAE) par des filaments d'*Aspergillus*. La chaleur et l'humidité représentent deux des facteurs de risque principaux de développer une otomycose. L'incidence est beaucoup plus élevée dans les zones tropicales que les pays tempérés. D'autres facteurs de risque sont également rapportés, comme un défaut d'hygiène locale, des otites bactériennes à répétition (avec instillation d'antibiotiques), un traumatisme local, la présence de corps étrangers dans le CAE (écouteurs, aides auditives), les baignades fréquentes

ou un diabète non contrôlé (41, 42). L'atteinte au cours d'une otomyose est généralement unilatérale et entraîne des démangeaisons, des douleurs au niveau du conduit auditif ou de l'oreille, une otorrhée, des acouphènes, une sensation d'oreille bouchée, jusqu'à une perte d'audition. L'évolution est subaiguë ou chronique et un traitement local est la plupart du temps suffisant. Dans certains cas, l'atteinte peut être plus sévère et entraîner une perforation tympanique ou toucher l'oreille moyenne. Dans ces cas-là, le traitement peut être plus long et systémique. Enfin, chez les patients présentant une immunodépression générale, les otomyoses peuvent être la porte d'entrée d'une infection invasive.

- **Onychomycoses**

Les onychomycoses correspondent à une atteinte fongique des ongles. Parmi les différents agents étiologiques retrouvés, les *Aspergillus* ne représentent qu'entre 0,5 et 3% des cas (43, 44). Les facteurs de risque principaux pour développer une onychomycose à *Aspergillus* comprennent un traumatisme unguéal, l'âge avancé, le jardinage ou le contact avec des végétaux en décomposition, le climat et la marche pieds nus. L'immunosuppression peut également constituer un facteur de risque en entraînant des dommages au niveau des différents phanères, dont les ongles. L'atteinte est généralement disto-latérale sous-unguéale et a lieu préférentiellement au niveau des ongles des pieds. L'évolution est chronique et le traitement est long et fastidieux et peut associer un traitement systémique à un traitement local.

- **Kératomycoses**

Les kératomycoses correspondent à une atteinte fongique de la cornée qui peut évoluer vers une baisse de l'acuité visuelle ou une cécité totale. Parmi les différents agents étiologiques retrouvés, les *Aspergillus* représentent entre 10 et 50% des cas selon les régions et les études (45, 46). Le principal facteur de risque retrouvé correspond un traumatisme de la cornée avec un corps étranger, majoritairement d'origine végétale, mais aussi avec de la poussière, du sable, de la boue ou des matériaux inertes. Les travaux agricoles représentent la principale situation à risque dans les pays en voie de développement, tandis que dans les pays occidentaux il s'agit plutôt d'une mauvaise hygiène lors du port de lentilles de contact. Enfin d'autres facteurs de risque existent, comme la préexistence d'une pathologie cornéenne, une sécheresse oculaire ou l'utilisation de glucocorticoïdes locaux. Le traitement repose sur l'utilisation d'antifongiques en usage systémique et local plus ou moins associés à une intervention chirurgicale.

- **Aspergilloses pulmonaires chroniques (APC)**

Les APC atteignent des patients présentant une pathologie pulmonaire sous-jacente et sont caractérisées par une atteinte des surfaces muqueuses sans envahissement des tissus. Les principaux facteurs de risques retrouvés sont ceux liés à l'existence de cavités sur poumon séquellaire : un antécédent de tuberculose traitée, une mycobactériose atypique ancienne, une broncho-pneumopathie chronique obstructive (BPCO), des bronchiectasies, une ABPA, une sarcoïdose ou un antécédent de cancer du poumon (47). Les principaux symptômes des APC sont une altération de l'état général avec perte de poids, sueur, anorexie, toux chronique productive, dyspnée et hémoptysies. Le diagnostic repose surtout sur l'imagerie pulmonaire et sur la présence d'anticorps anti-*Aspergillus* spécifiques. La présence d'une colonisation à *Aspergillus* est également un facteur devant faire évoquer le diagnostic d'APC.

Suivant l'atteinte pulmonaire, les APC peuvent être classées en trois formes cliniques principales : l'aspergillome, l'aspergillose pulmonaire cavitaire chronique (*chronic cavitary pulmonary aspergillosis* ou CCPA) et l'aspergillose pulmonaire chronique nécrosante (*chronic necrotising pulmonary aspergillosis* ou CNPA) (39).

L'aspergillome est une forme clinique particulière correspondant à un conglomérat de filaments mycéliens, de fibrine, de mucus et de débris cellulaires (ou « truffe aspergillaire ») qui se forme dans une cavité pulmonaire préformée (Figure 10A). Ceci survient notamment chez des patients présentant un antécédent de tuberculose traitée. L'aspergillome peut évoluer à bas bruit pendant plusieurs années sans autres symptômes que des hémoptysies irrégulières et de faible abondance (39). Ces hémoptysies peuvent être fatales en cas de rupture d'un gros vaisseau. Le traitement de cette forme d'aspergillose est chirurgical avec le retrait de la truffe aspergillaire et l'embolisation des vaisseaux en cas de menace de rupture (47).

Les CCPA et CNPA sont caractérisées par des cavités pulmonaires avec ou sans aspergillome, des infiltrats, des nodules et un certain degré de fibrose pulmonaire ou pleurale (Figure 10B). Ces deux formes peuvent être beaucoup plus symptomatiques et d'évolution plus rapide que l'aspergillome et nécessitent un traitement antifongique (47). En cas de baisse de leur immunité générale, ces patients sont à risque de développer une aspergillose invasive.

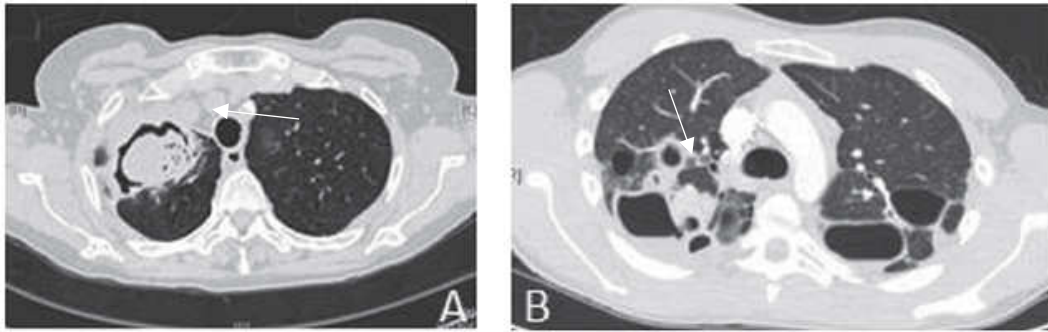


Figure 10 : Scanners pulmonaires de patients avec un aspergillome (A) et une CCPA (B)
(Kosmidis et Denning, *Thorax* 2015)

3.2.4. Aspergilloses invasives

L'aspergillose invasive (AI) correspond à une invasion tissulaire du champignon. Elle a été décrite pour la première fois en 1844 par John Hugues Bennet (48). Bien que relativement rare par rapport aux autres formes cliniques d'aspergilloses, son incidence est en constante augmentation depuis la deuxième moitié du vingtième siècle (49). Ainsi, en 2016, l'incidence annuelle des AI était estimée à 300 000 cas dans le monde (35). En France, sur la même période, 1185 cas ont été estimés (50).

L'apparition de nouvelles stratégies thérapeutiques (traitement des hémopathies malignes, transplantation d'organe solide, utilisation de biothérapies) avec une augmentation de l'utilisation des traitements immunosuppresseurs, et l'amélioration des pratiques réanimatoires, sont deux raisons expliquant l'augmentation de l'incidence des AI observées ces dernières années (49, 51).

- **Patients à risque d'aspergillose invasive**

Les AI concernent principalement les patients présentant une immunodépression générale profonde. Chez les hôtes immunocompétents, le système immunitaire inné, et particulièrement les PNN, s'attaque aux conidies germées et aux filaments, inhibant ainsi leur croissance. En cas de défaut d'action des PNN, les filaments vont pouvoir envahir les tissus et les vaisseaux sanguins grâce à la production d'enzymes protéolytiques, aboutissant à leur destruction et mettant en jeu le pronostic vital des patients. Un déficit quantitatif ou qualitatif des PNN représente donc un des facteurs majeurs de risque de développer une AI (52, 53).

Les patients souffrant de granulomatose septique chronique (*chronic granulomatous disease* [CGD]), représentent la population la plus à risque de développer une AI avec une incidence allant de 20 à 40% (53). Cette pathologie est caractérisée par un déficit qualitatif en NADPH

oxydase, aboutissant à un défaut de production de formes réactives de l'oxygène par les PNN, qui n'exercent donc plus leur action anti-aspergillaire. Cependant, la CGD reste une maladie rare et les cas d'AI associés à cette pathologie ne représentent qu'un faible pourcentage de l'ensemble des cas d'AI.

Les situations actuelles les plus fréquemment associées à une AI sont les neutropénies profondes (PNN < 0,5 G/l) et prolongées (> 10 jours) ainsi que l'utilisation de fortes doses de corticoïdes (> 0,3 mg/kg/j) ou d'autres immunosuppresseurs, connus pour altérer les fonctions de défense des PN (54, 55). On retrouve donc principalement les patients en oncologie en traitement d'induction ou de rattrapage d'une hémopathie maligne ou ayant subi une allogreffe de moelle osseuse (AGMO), et les patients transplantés d'organe solide avec des variations selon le type de pathologie sous-jacente (56–61).

Cependant, il existe un nombre croissant d'AI survenant chez des patients ne présentant pas ces facteurs de risque dits « classiques ». Parmi ceux-ci, on retrouve principalement des patients de réanimation dans un état très sévère, comme les patients en insuffisance terminale d'organe ou en sepsis grave (62–65). Ces situations entraînent des perturbations du système immunitaire, favorisant ainsi le développement du champignon. On retrouve aussi comme facteurs de risque émergents d'AI, les cirrhoses terminales (66), les BPCO sévères ou les cancers solides terminaux (67). Les syndromes de détresse respiratoire aiguë (SDRA), notamment secondaires à une infection grippale sévère (68), et nécessitant la mise sous oxygénation membranaire extra-corporelle (*extra corporal membrane oxygenation* ou ECMO), sont également des facteurs de risque de survenue d'AI (69). Enfin, des cas d'AI ont aussi été décrits chez des patients présentant une infection COVID-19 sévère et hospitalisés en réanimation (70).

- **Formes cliniques d'aspergillose invasive**

Du fait de l'inhalation quotidienne de plusieurs centaines de conidies, le tractus respiratoire représente la cible principale des infections invasives, avec comme pathologie principale l'aspergillose pulmonaire invasive (API) (71). D'autres organes peuvent être atteints (cerveau, cœur, rein, tube digestif, peau), soit secondairement à une localisation pulmonaire - par dissémination par voie générale ou par contiguïté - soit plus rarement par inoculation directe du champignon dans les tissus (chirurgie, perte de l'épithélium cutané, traumatisme). Les

principaux symptômes associés sont non spécifiques de la maladie mais reflètent l'atteinte de l'organe envahi par le champignon.

- **Aspergillose pulmonaire invasive**

La croissance du champignon dans le parenchyme pulmonaire va entraîner sa destruction par le biais de deux mécanismes distincts : un phénomène broncho-invasif et un phénomène angio-invasif (72). Cette destruction du parenchyme pulmonaire est responsable de symptômes respiratoires non spécifiques, allant de la simple toux fébrile à la détresse respiratoire aiguë, en passant par une dyspnée, des douleurs thoraciques ou des hémoptysies (51).

La phase broncho-invasive correspond à une nécrose inflammatoire du parenchyme pulmonaire consécutive à une infiltration cellulaire et survient précocement après la pénétration du champignon (72). Les signes à l'imagerie sont non spécifiques et peuvent être des micro-nodules, des plages de verre dépoli, des opacités nodulaires d'aspect arbres en bourgeon ou des bronchiectasies (73). De plus, cette phase étant généralement peu symptomatique, il est difficile de diagnostiquer une API à ce stade.

La phase angio-invasive est beaucoup plus bruyante et correspond à une nécrose ischémique du tissu pulmonaire. Elle résulte de l'invasion des vaisseaux sanguins par le champignon ce qui va entraîner des infarctus hémorragiques et des obstructions vasculaires (72). C'est souvent au moment de cette phase là que le diagnostic d'API est effectué.

Au niveau de l'imagerie, un signe particulièrement évocateur de cette forme est la présence d'un nodule avec signe du halo (Figure 11A). Il correspond à une zone d'infarctissement et de nécrose centrale (nodule) avec en périphérie une plage hémorragique et œdémateuse (halo). Ce signe du halo est un événement précoce de la phase angio-invasive et tend vers la formation d'une cavité avec apparition du signe du croissant gazeux (figure 11B) après restauration des PNN et/ou traitement antifongique (74). Il est donc possible de passer à côté du halo si le scanner n'est pas réalisé précocement. Bien qu'évocateur d'API, le halo n'est pas spécifique et peut être retrouvé dans d'autres infections fongiques invasives ou bactériennes. Enfin de nombreuses autres images non spécifiques (infiltrat diffus, verre dépoli...) peuvent aussi apparaître au cours de la phase angio-invasive compliquant ainsi le diagnostic (figure 11C).

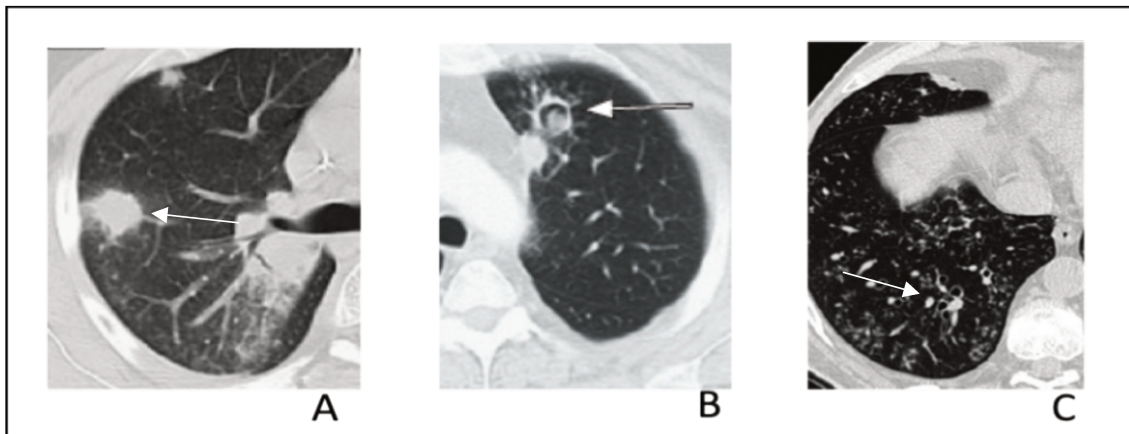


Figure 11 : Scanners pulmonaires de patients avec une aspergillose invasive : nodule avec signe du halo (A), signe du croissant gazeux (B) et nodules centro-lobulaires avec opacités en arbre en bourgeon (C) (Caillot et al, *Eur. J. Radiol.* 2010, Segal, *N. Engl. J. Med.* 2009, Bergeron et al, *Blood* 2012)

Malgré une meilleure connaissance de la pathologie ainsi qu'un diagnostic plus précoce et l'utilisation d'antifongiques adaptés, le pronostic de l'API reste sombre avec une mortalité attribuable de 10% (75). La mortalité globale à un an qui varie entre 40 et 75% reflète par ailleurs le terrain sous-jacent extrêmement sévère des patients (51).

3.3. Espèces impliquées en pathologie humaine

Historiquement, seules quelques espèces d'*Aspergillus*, dont *A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* et *A. nidulans*, étaient considérées comme pathogènes chez l'Homme. Selon plusieurs programmes de surveillance menés au début des années 2000 (SAIF, TRANSNET, PATH), ces 5 espèces représentaient entre 91,5% et 98% des isolats identifiés au cours des aspergilloses invasives en Amérique du nord et en Europe (56–61). Parmi ces espèces, *A. fumigatus* était de loin l'espèce la plus fréquemment retrouvée dans les infections invasives, avec une proportion allant de 65 à 80 % des isolats. Les isolats ne faisant pas partie de ces 5 espèces étant identifiés uniquement au niveau du genre, sauf pour l'étude de Steinbach et al. où 3 espèces supplémentaires ont été identifiées comme responsables d'infection invasive (*A. versicolor* [3,1%], *A. ustus* [0,8%] et *A. glaucus* [0,3%]).

Cependant ces dernières années, avec l'amélioration des outils d'identification, une diversité bien plus importante des espèces impliquées dans les infections invasives a été mise en évidence. Ainsi, l'identification moléculaire rétrospective des isolats issus du programme de surveillance TRANSNET aux Etats-Unis, a révélé 7 espèces cryptiques responsables d'aspergillose invasive (*A. calidoustus*, *A. sydowii*, *A. tubingensis*, *A. lentulus*, *A. udagawae*,

A. quadrilineatus et *A. thermomutatus*) pour une prévalence de 10,5% (23/218) (76). Une étude multicentrique en Espagne a également montré une prévalence de 11,8% d'espèces cryptiques dans les infections invasives, dont les espèces *A. calidoustus*, *A. sydowii*, *A. tubingensis* et *A. alliaceus* (77). Enfin, une étude monocentrique prospective sur 2 ans menée en Corée du Sud, a montré une prévalence d'espèces cryptiques dans les aspergilloses invasives, de plus de 30% (78). Sept espèces cryptiques différentes ont été retrouvées lors de cette étude : *A. tubingensis*, *A. welwitschiae*, *A. acidus*, *A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. sydowii* et *A. persii*.

De façon isolée, de nouvelles espèces sont également régulièrement décrites comme responsables d'infections invasives. Tsang et *al.* ont ainsi listé les espèces nouvellement décrites depuis 2013 et rapportées dans la littérature comme impliquées dans des aspergilloses invasives. Ces espèces sont *A. citrinoterreus*, *A. felis*, *A. pseudofelis*, *A. parafelis*, *A. sublatus*, *A. palidofulvus*, *A. pseudosclerotiorum*, *A. pseudoviridinutans*, *A. reticulatus* et *A. spinulosporus* (79).

Actuellement, près d'une trentaine d'espèces cryptiques appartenant à 7 sections différentes ont été décrites dans les infections invasives (Tableau 5).

Les espèces cryptiques sont également de plus en plus retrouvées lors d'infections chroniques, qu'elles soient respiratoires, auriculaires ou unguéales. Concernant les otomycoses, les 5 espèces historiques ont été décrites comme responsables de l'atteinte. Cependant, à la différence des infections invasives, *A. fumigatus* n'est que rarement retrouvé. Ce sont les espèces appartenant à la section *Nigri* qui sont considérées comme les principaux agents étiologiques, suivies par celles de la section *Flavi*. Concernant la section *Nigri*, l'espèce la plus fréquemment retrouvée est l'espèce cryptique *A. tubingensis*, loin devant, ou au même niveau que *A. niger*, selon les études (42, 80, 81). D'autres espèces ont également été décrites parmi lesquelles *A. welwitschiae* et *A. brasiliensis* (aussi de la section *Nigri*), *A. tamarisii*, *A. alabamensis*, *A. sydowii*, *A. ochraceus* ou *A. candidus* (Tableau 5).

Concernant les onychomycoses, les espèces appartenant aux sections *Nigri* et *Flavi* sont considérées comme les principaux agents étiologiques (43). Cependant, d'autres sections sont aussi retrouvées avec une importante diversité en termes d'espèces, notamment pour les sections *Nidulantes* (*A. unguis*, *A. stellatus*, *A. quadrilineatus*, *A. versicolor*, *A. sydowii*, *A. creber*, *A. jensenii*, *A. hongkongensis*, *A. fructus*) et *Circumdati* (*A. persii*, *A. subramanianii*, *A. sclerotiorum*, *A. westerdijkiae*, *A. insulicola*) (Tableau 5).

Concernant les kératites aspergillaires, *A. flavus* représente de loin l'espèce la plus fréquente (75% des cas), suivie par *A. fumigatus* (11,5%), selon une étude menée en Inde (46). Sept espèces cryptiques ont également été rapportées dans cette étude dont *A. nomius*, *A. pseudonomius*, *A. tamaritii* (section *Flavi*), *A. tubingensis*, *A. brasiliensis* (section *Nigri*), *A. sydowii* (section *Nidulantes*) et *A. montevidensis* (section *Aspergillus*) (Tableau 5).

La colonisation du tractus respiratoire reste quant à elle, principalement dominée par *A. fumigatus*. Cependant une part non négligeable d'espèces cryptiques a été rapportée. Ainsi, une étude prospective multicentrique en Espagne a montré que les espèces cryptiques représentaient 12,5% (7 espèces différentes) des *Aspergillus* identifiés dans les prélèvements respiratoires (82). Une autre étude menée sur 2 ans au Royaume-Uni, portant uniquement sur la colonisation des patients présentant une APC ou des réactions d'hypersensibilité, a mis en évidence 22 espèces cryptiques différentes, pour une prévalence de 2,5% par rapport au total des *Aspergillus* retrouvés (83).

Au cours de la mucoviscidose, la colonisation peut également impliquer des espèces cryptiques. Devoto et *al.* ont ainsi mis en évidence 6 espèces cryptiques différentes avec une prévalence de 6,4% parmi l'ensemble des *Aspergillus* identifiés, chez 50 patients en Argentine (84). Parmi les espèces cryptiques retrouvées au cours de la mucoviscidose, celles de la section *Fumigati* (*A. lentulus*, *A. thermomutatus*) semblent relativement fréquentes (85).

Enfin, parmi tous les *Aspergillus* issus de prélèvements d'origine humaine, plusieurs études ont montré que les espèces cryptiques représentaient entre 7,5 et 15% du total des espèces identifiées, avec une importante diversité en termes d'espèces (77, 86–88).

Ainsi, bien que les espèces non cryptiques (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* et *A. nidulans*) restent majoritaires, en moins d'une décennie, nous sommes passés de 5 espèces principales impliquées en pathologie humaine, à plus d'une centaine pouvant être retrouvées dans des prélèvements humains (Tableau 5) (89).

Sections	Espèces	Aspergillose invasive	Colonisation bronchique / APC / Sinusite	Onychomycose	Kératite	Otite
Fumigati	<i>A. lentulus</i>	Oui	Oui	Oui		
	<i>A. hiratsukae</i>	Oui	Oui	Oui	Oui	
	<i>A. thermomutatus</i>	Oui	Oui	Oui		
	<i>A. fischeri</i>	Oui	Oui			
	<i>A. udagawae</i>	Oui	Oui		Oui	
	<i>A. viridinutans</i>	Oui	Oui	Oui	Oui	
	<i>A. fumigati</i>		Oui			
	<i>A. novofumigatus</i>	Oui	Oui			
	<i>A. felis</i>	Oui	Oui	Oui		
	<i>A. fumisynnematus</i>		Oui			
	<i>A. fischerianus</i>		Oui			
	<i>A. turcosus</i>		Oui			
	<i>A. aureolus</i>		Oui			
Nigri	<i>A. tubingensis</i>	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	<i>A. welwitschiae</i>	Oui	Oui	Oui		Oui
	<i>A. carbonarius</i>			Oui		
	<i>A. brasiliensis</i>				Oui	Oui
	<i>A. luchuensis</i>		Oui			
	<i>A. japonicus</i>					
	<i>A. aculeatus</i>		Oui		Oui	
<i>A. uvarum</i>		Oui				
Flavi	<i>A. tamarii</i>	Oui	Oui		Oui	Oui
	<i>A. nomius</i>	Oui	Oui		Oui	
	<i>A. arachidicola</i>		Oui			
	<i>A. transmontanensis</i>		Oui			
	<i>A. alliaceus</i>	Oui	Oui			
	<i>A. cealatus</i>		Oui			
<i>A. minisclerotigenes</i>						
Terrei	<i>A. hortai</i>		Oui	Oui		
	<i>A. carneus</i>					
	<i>A. alabamensis</i>		Oui	Oui		Oui
	<i>A. citrinoterreus</i>	Oui	Oui			
	<i>A. floccosus</i>					
<i>A. neoffricanus</i>						
Nidulantes	<i>A. rugulosus</i>	Oui	Oui			
	<i>A. unguis</i>			Oui		
	<i>A. stellatus</i>			Oui		
	<i>A. spinulosporus</i>	Oui	Oui			
	<i>A. subblatus</i>	Oui	Oui			
	<i>A. quadrillineatus</i>	Oui	Oui	Oui		
	<i>A. versicolor</i>		Oui	Oui		Oui
	<i>A. sydowii</i>	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui
	<i>A. fructus</i>	Oui	Oui			
	<i>A. tennesseensis</i>					
	<i>A. tabacinus</i>		Oui			
	<i>A. creber</i>		Oui	Oui		
	<i>A. amoenus</i>		Oui			
	<i>A. protuberus</i>		Oui			
	<i>A. puulaauiensis</i>		Oui			
	<i>A. jensenii</i>		Oui		Oui	
<i>A. hongkongensis</i>				Oui		
Usti	<i>A. calidoustus</i>	Oui	Oui		Oui	
	<i>A. insuetus</i>		Oui			
	<i>A. kevei</i>		Oui			
	<i>A. ustus</i>	Oui	Oui			
	<i>A. pseudodefectus</i>	Oui	Oui			
	<i>A. granulosis</i>	Oui	Oui			
Circumdati	<i>A. westerdijkiae</i>	Oui	Oui	Oui		
	<i>A. persii</i>			Oui		
	<i>A. fresenii</i>			Oui		
	<i>A. insulicola</i>			Oui		
	<i>A. ochraceus</i>	Oui	Oui			Oui
	<i>A. sclerotiorum</i>		Oui		Oui	
	<i>A. ochraceopetaliformis</i>		Oui			
	<i>A. pseudosclerotiorum</i>	Oui	Oui			
	<i>A. subramanianii</i>	Oui	Oui			
	<i>A. pseudoelegans</i>					
<i>A. palidofulvus</i>		Oui				
Candidi	<i>A. candidus</i>			Oui		Oui
	<i>A. tritici</i>			Oui		
	<i>A. pragensis</i>			Oui		
Clavati	<i>A. clavatus</i>					
	<i>A. giganteus</i>		Oui			
Cervini	<i>A. cervinus</i>			Oui		
Cremeri	<i>A. wentii</i>		Oui	Oui		
Aspergillus	<i>A. costiformis</i>			Oui		
	<i>A. ruber</i>			Oui		
	<i>A. pseudoglaucus</i>		Oui	Oui		
	<i>A. proliferans</i>			Oui		
	<i>A. chevalieri</i>		Oui			
<i>A. montevidensis</i>		Oui	Oui		Oui	
Flavipedes	<i>A. flavipes</i>					

Tableau 5 : Répartition par type de pathologies des espèces cryptiques retrouvées dans des prélèvements humains

4. Sensibilité et résistance des *Aspergillus* aux antifongiques

L'usage d'un antifongique est souvent requis pour le traitement des aspergilloses. C'est particulièrement vrai pour la prise en charge des AI, où l'initiation la plus précoce d'un traitement antifongique ciblé et efficace représente le meilleur facteur pronostique et un des éléments clés dans l'évolution de la pathologie (90). Cependant, en médecine humaine, peu de classes d'antifongiques et de molécules sont disponibles, à la différence de l'industrie agroalimentaire, qui a à sa disposition de nombreuses molécules. De plus, l'étude de la sensibilité des *Aspergillus* aux antifongiques a mis en évidence une hétérogénéité au sein du genre. En effet, certaines espèces peuvent présenter une résistance naturelle à un ou plusieurs antifongiques et certains isolats naturellement sensibles, peuvent acquérir des résistances à partir de l'environnement. Il est donc primordial de bien connaître les spectres de sensibilité des différentes espèces pour optimiser la prise en charge des patients présentant une infection aspergillaire.

4.1. Principaux antifongiques à usage médical actifs contre les *Aspergillus*

4.1.1. Polyènes

Le seul représentant de la famille des polyènes actif par voie générale contre les *Aspergillus* est l'amphotéricine B, sous forme classique ou sous forme de dérivé lipidique. Elle est produite naturellement par la bactérie *Streptomyces nodosus*.

L'amphotéricine B exerce une activité fongicide sur les champignons du genre *Aspergillus* en interagissant avec l'ergostérol, un des principaux constituants de la membrane cytoplasmique fongique, créant ainsi des pores dans la membrane et une fuite du contenu cellulaire (Figure 12). Sa sélectivité vis-à-vis des champignons vient du fait que l'ergostérol n'est pas retrouvé dans la membrane cytoplasmique des cellules humaines.

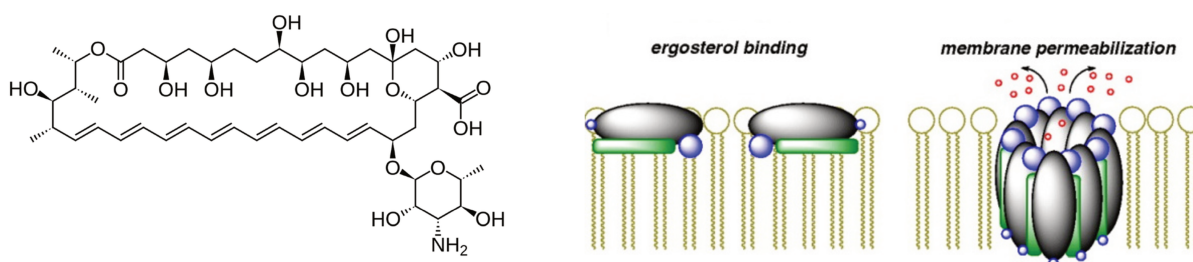


Figure 12 : Amphotéricine B, structure moléculaire (gauche) et mécanisme d'action (droite)

4.1.2. Triazolés

Les antifongiques triazolés utilisés en médecine humaine comprennent 4 composés utilisables par voie systémique et possédant une activité fongicide contre les champignons du genre *Aspergillus* : l'itraconazole, le voriconazole, le posaconazole et l'isavuconazole. Ils agissent en inhibant la lanostérol-14 α -déméthylase (ou CYP51), empêchant ainsi la formation d'ergostérol, un composant majeur de la membrane cytoplasmique du champignon. De plus l'inhibition de l'enzyme entraîne une accumulation de différents 14 α -méthylstéroïls toxiques pour le champignon inhibant ainsi sa croissance (Figure 13).

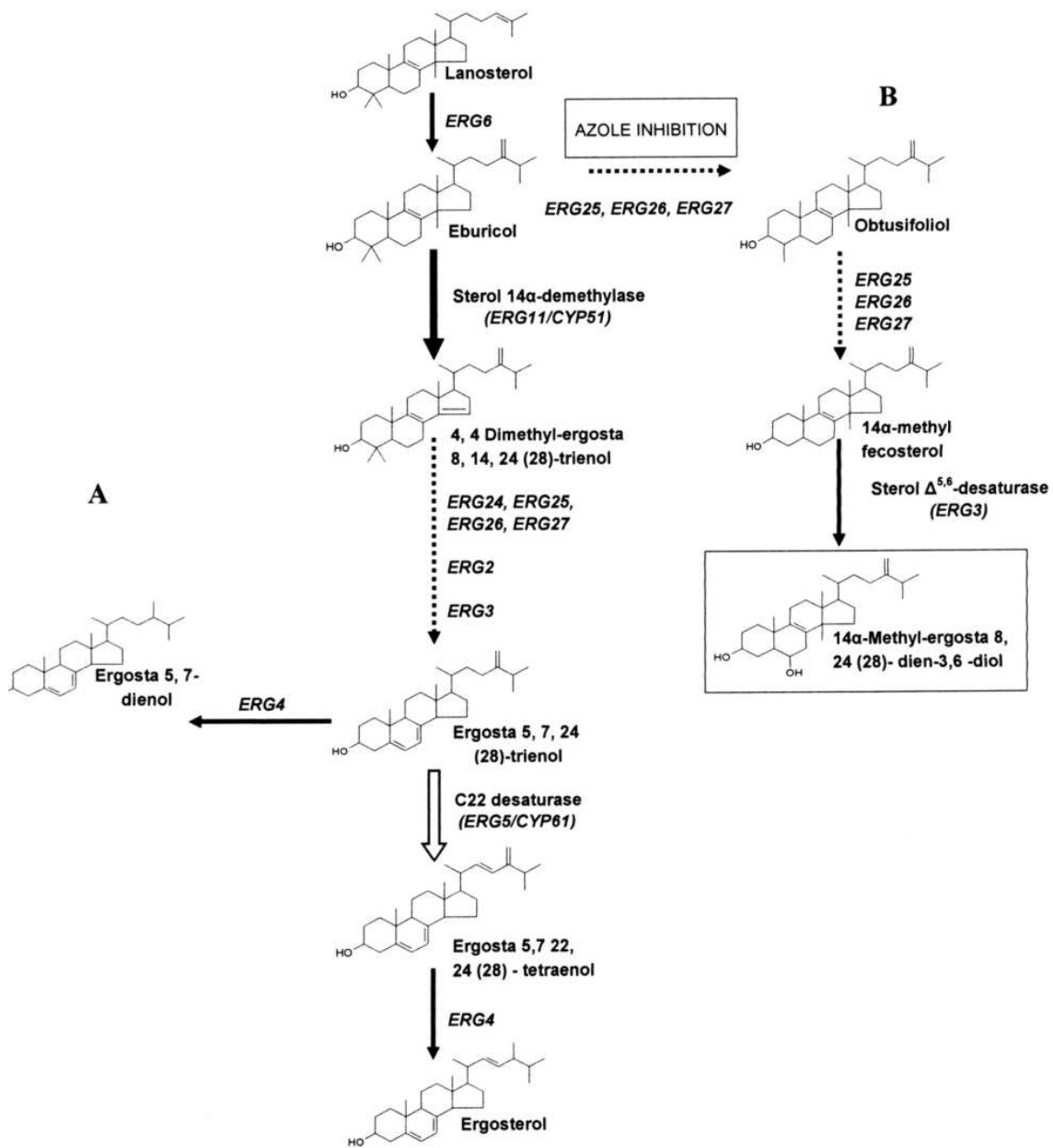


Figure 13 : Mécanisme d'action des antifongiques azolés

4.1.3. Echinocandines

Il existe trois composés appartenant à la famille des échinocandines utilisés chez l'homme : la caspofungine, la micafungine et l'anidulafungine. Les échinocandines sont des dérivés hémisynthétiques issus de métabolites produits respectivement par les champignons *Glarea lozoyensis*, *Coleophoma empetri* et *Aspergillus nidulans*. Elles exercent contre *Aspergillus* une activité fongistatique en inhibant la 1,3- β -glucane synthase, empêchant ainsi la production de 1,3- β -glucane, un composant majeur de la paroi fongique.

4.1.4. Autres antifongiques

La terbinafine, de la classe des allylamines, présente également une activité antifongique contre certaines espèces d'*Aspergillus*, en inhibant la squalène époxydase, une enzyme impliquée dans la synthèse de l'ergostérol (91). Cependant, son utilisation dans la prise en charge des aspergilloses est très limitée.

De nouvelles classes d'antifongiques sont également en développement. Parmi celles-ci, l'olorofim de la classe des orotomides présente une activité *in vitro* prometteuse contre les *Aspergillus*, en inhibant la dihydroorate déshydrogénase, impliquée dans la synthèse des bases azotées pyrimidiques (92).

4.2. Méthodes d'étude de la sensibilité aux antifongiques

L'étude de la sensibilité aux antifongiques se fait principalement *in vitro* par la mesure de la concentration minimale inhibitrice (CMI) d'un antifongique donné vis-à-vis de l'isolat à étudier. Cette CMI correspond à la plus faible concentration d'antifongique capable d'inhiber la croissance du champignon. Pour la déterminer, il existe des méthodes de microdilution en milieu liquide, dont certaines sont considérées comme des méthodes de référence, et des méthodes de diffusion en milieu gélosé. Une fois la CMI obtenue, il est possible de la comparer aux référentiels existants, ce qui permettra en fonction des seuils de CMI proposés de classer l'isolat en sensible ou résistant.

Des méthodes de dépistage de la résistance sans mesure de la CMI existent aussi. Elles reposent sur l'utilisation de géloses imprégnées d'un antifongique à une concentration élevée.

4.2.1. Méthodes de microdilution en milieu liquide

Les méthodes de microdilution en milieu liquide représentent les méthodes de référence pour la détermination des CMI, aussi bien pour les levures que pour les champignons filamenteux. Deux organismes, le *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) et l'*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST), proposent chacun une méthodologie différant l'une de l'autre notamment par le milieu de culture utilisé, le temps d'incubation ou le mode de lecture (93, 94). Cependant le principe de base reste le même entre les 2 méthodes. Une gamme croissante d'antifongique en milieu liquide est préparée au sein d'une microplaque, avec une dilution de raison 2 entre chaque puits. Un inoculum standardisé, constitué d'une suspension du champignon à étudier, est ensuite distribué dans tous les puits. Après incubation, la CMI sera donnée par la concentration du premier puits dans lequel une absence de pousse du champignon sera visible (Figure 14). Ces deux méthodes restent lourdes à mettre en œuvre et sont réservées habituellement aux centres experts.



Figure 14 : Lecture visuelle d'une concentration minimale inhibitrice (CMI) en milieu liquide par la méthode EUCAST

A côté de ces deux méthodes de référence, des méthodes commerciales reposant sur le même principe, et disposant d'un indicateur coloré, sont également disponibles (Sensititre YeastOne [ThermoFisher], Micronaut [Bruker]). Cependant, elles restent plutôt réservées aux levures.

4.2.2. Méthodes de diffusion en milieu gélosé

Des méthodes de diffusion en milieu gélosé ont été développées. Elles sont beaucoup plus simples à mettre en œuvre que les méthodes de référence et reposent sur l'utilisation de bandelettes imprégnées d'un gradient de concentration de l'antifongique à étudier. Une fois les bandelettes déposées sur une gélose, l'antifongique va diffuser instantanément créant ainsi un gradient dans la gélose. Pour mesurer la CMI, un inoculum standardisé constitué d'une suspension du champignon à étudier est étalé sur la gélose de manière homogène avant le dépôt des bandelettes. Après incubation, une ellipse d'inhibition de croissance du champignon sera observable. La CMI correspondra à la concentration située à l'intersection entre la bandelette et l'ellipse d'inhibition (Figure 15). Bien que la mise en œuvre de cette méthode soit aisée, la lecture de la CMI peut s'avérer problématique dans certains cas. Plusieurs marques de bandelettes sont disponibles, parmi lesquelles les plus utilisées sont les E-tests de Biomérieux.

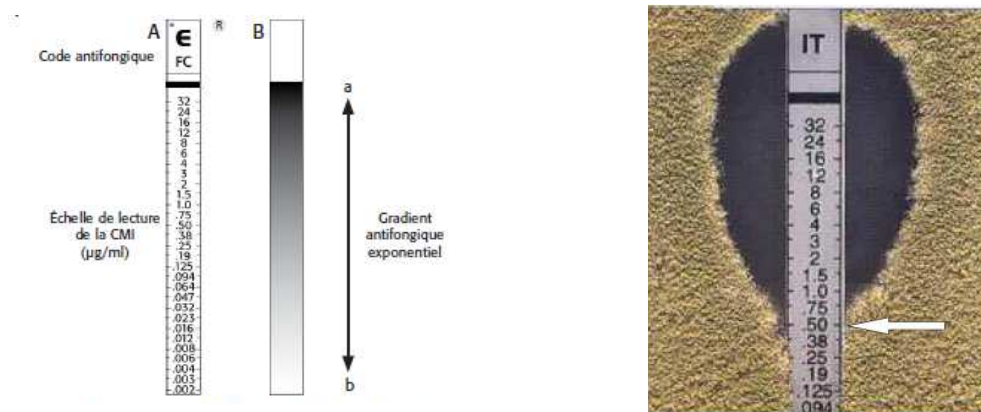


Figure 15 : Principe des bandelettes à gradient de concentration (gauche) et détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) (droite)

4.2.3. Méthodes de dépistage

Les méthodes de dépistage ont été développées afin de mettre en évidence une éventuelle résistance aux antifongiques sans avoir à mesurer la CMI. Elles reposent sur l'utilisation de géloses imprégnées d'antifongiques à une concentration supérieure au seuil de sensibilité. L'isolat à tester est mis en culture sur cette gélose, et en cas de résistance à l'antifongique une pousse du champignon sera observée après incubation. En cas de sensibilité, l'antifongique dans la gélose inhibera la croissance du champignon. Il existe une méthode commerciale

constituée par une boîte divisée en 4 puits et contenant chacun une gélose imprégnée par de l'itraconazole, du voriconazole, du posaconazole ou aucun antifongique (VIPcheck, EWC Diagnostics) (95, 96). L'EUCAST propose également une procédure pour préparer ses propres milieux de dépistage avec les antifongiques désirés (97). Ce sont des méthodes qui sont surtout utilisées pour dépister la résistance des champignons filamenteux aux antifongiques azolés (Figure 17).

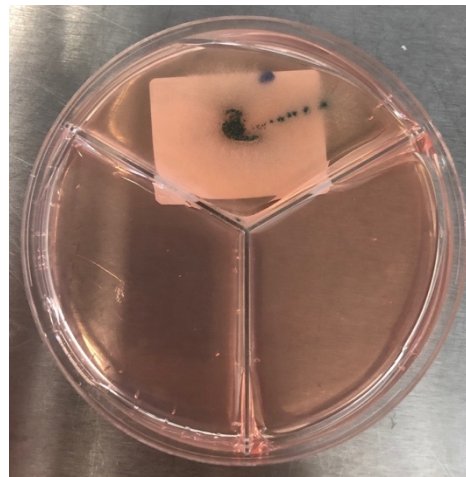
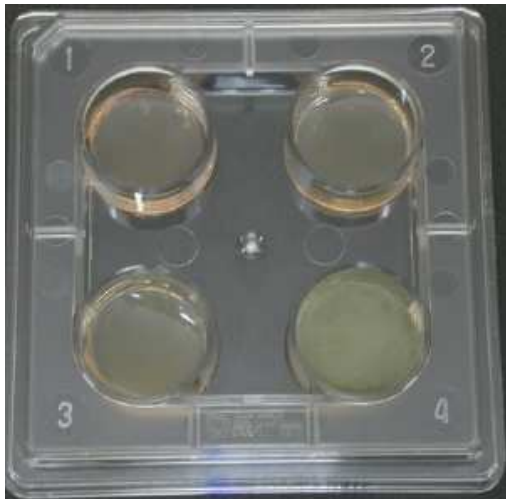


Figure 16 : Gélises imprégnées d'une concentration fixe d'antifongique, méthode commerciale VIPcheck (gauche) et méthode « maison » (droite)

4.2.4. Interprétation des CMI

Une fois les CMI obtenues par les différentes méthodes, il faut les interpréter par rapport aux seuils proposés par les référentiels. Deux types de seuils existent : les seuils cliniques (*clinical breakpoints* ou CBP) et les seuils épidémiologiques (*epidemiological cutoff* ou ECOFF). La détermination des CBP repose sur des études cliniques et pharmacocinétiques prenant en compte l'efficacité thérapeutique et permettent de classer les isolats en sensible, intermédiaire ou résistant. Les ECOFF sont déterminés par des études microbiologiques et permettent uniquement de classer les isolats en sauvage ou non sauvage. La détermination d'un ECOFF nécessite l'analyse des CMI d'au moins 100 isolats, réalisée par au moins 3 centres différents pour chacun des isolats.

Ces seuils sont propres à une espèce donnée, pour un antifongique donné et selon une méthode donnée. En cas d'absence de CBP ou d'ECOFF, il n'est donc pas possible, en

théorie, d'interpréter les CMI obtenues avec des seuils d'une autre espèce ou d'une autre méthode. Ceci pourrait induire des erreurs d'interprétations.

Malheureusement, concernant les *Aspergillus*, très peu de seuils ont été déterminés pour le moment. Il n'existe des CBP que pour la technique de microdilution en milieu liquide de l'EUCAST, et ils ne concernent que les 5 espèces « historiques » *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* et *A. terreus* (Tableau 6) (98).

Antifongiques	CMI clinical breakpoints (mg/l)									
	<i>A. flavus</i>		<i>A. fumigatus</i>		<i>A. nidulans</i>		<i>A. niger</i>		<i>A. terreus</i>	
	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >	S ≤	R >
Amphotéricine B	-	-	1	1	-	-	1	1	-	-
Itraconazole	1	1	1	1	1	1	-	-	1	1
Voriconazole	-	-	1	1	1	1	-	-	-	-
Posaconazole	-	-	0,125	0,25	-	-	-	-	0,125	0,25
Isavuconazole	1	2	1	2	0,25	0,25	-	-	1	1

Tableau 6 : *Clinical breakpoints* définis par l'EUCAST pour différentes espèces d'*Aspergillus*

Les ECOFF sont un peu plus développés que les CBP, notamment pour la méthode de microdilution du CLSI, pour les bandelettes à gradient de concentration ou en cas d'absence de CBP pour l'EUCAST (99, 100). Cependant, comme pour les CBP, les ECOFF ne concernent principalement que les 5 espèces « historiques » et il n'existe toujours pas de seuil pour les espèces cryptiques d'*Aspergillus*. L'interprétation des CMI pour le genre *Aspergillus* reste donc pour le moment, particulièrement délicate, peu importe la méthode utilisée.

4.3. Résistance des *Aspergillus* aux antifongiques

Devant la difficulté d'interprétation des CMI, les données concernant la résistance des *Aspergillus* aux antifongiques concernent principalement les 5 espèces « historiques ». Ainsi *A. fumigatus*, *A. niger* et *A. flavus* sont considérés comme étant naturellement sensibles à tous les antifongiques, *A. nidulans* présentant une sensibilité variable à l'amphotéricine B et *A. terreus* est considéré comme résistant naturellement à l'amphotéricine B. Cependant ces dernières années une hétérogénéité bien plus importante a été mise en évidence.

Ainsi d'un côté, la meilleure identification des espèces cryptiques et des espèces rares a permis de détecter de nouvelles espèces présentant des CMI élevées à un ou plusieurs

antifongiques. Cela peut être le cas pour une section entière, comme par exemple la section *Usti* où l'ensemble des espèces testées ont présenté des CMI élevées à tous les antifongiques azolés (101), ou la section *Circumdati* où toutes les espèces présentent des CMI élevées à l'amphotéricine B (102). Mais cela peut également être le cas pour des espèces en particulier au sein d'une section. Ainsi, au sein de la section *Fumigati* à laquelle appartient *A. fumigatus*, plusieurs espèces ont montré des CMI élevées aux antifongiques azolés uniquement (*A. thermomutatus*, *A. fischeri*, *A. felis*, *A. pseudoviridinutans*, *A. novofumigatus*) ou en association à des CMI élevées pour l'amphotéricine B (*A. lentulus*, *A. udagawae*, *A. fumigatiaffinis*) (103–106). Au sein de la section *Flavi*, *A. alliaceus* a quant à lui montré des CMI très élevées à l'amphotéricine B (107). Des variations sont aussi observées dans la section *Nigri* où *A. tubingensis* présente des CMI plus élevées aux antifongiques azolés que les autres espèces (108, 109). D'autres profils particuliers ont également été mis en évidence et sont listés dans le tableau 7 (83, 107, 110–112).

Cependant, bien qu'en constante augmentation, les données disponibles sur les CMI des espèces cryptiques restent rares, et sont souvent obtenues à partir d'effectifs faibles. De plus des discordances de résultats existent entre les études, qui peuvent être liées principalement aux différences de méthodes utilisées.

Sections	Espèces	Antifongiques					
		Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole	Isavuconazole	Amphotéricine B	Echinocandines
Fumigati	<i>A. lentulus</i>	S/R	S/R	S/R	S/R	R	S
	<i>A. hiratsukae</i>	S	S	S	-	S	S
	<i>A. thermomutatus</i>	S/R	R	R	-	S	S
	<i>A. fischeri</i>	S/R	S/R	S/R	S/R	R	S/R
	<i>A. udagawae</i>	S	S/R	S/R	S	S/R	S
	<i>A. viridinutans</i>	R	R	R	-	S/R	S
	<i>A. fumigatiaffinis</i>	R	R	R	-	R	S
	<i>A. novofumigatus</i>	R	R	R	-	S	S
	<i>A. felis</i>	S/R	S/R	S/R	-	S/R	S
	<i>A. fumisynnematus</i>	S	S	S	-	S	S
	<i>A. fischerianus</i>	-	R	R	-	S	S
	<i>A. turcosus</i>	S/R	S/R	S/R	-	-	-
	<i>A. aureolus</i>	R	S	R	S	I	-
Nigri	<i>A. tubingensis</i>	S/R	S/R	S/R	-	S	S
	<i>A. welwitschiae</i>	S/R	S/R	S/R	-	S	S
	<i>A. brasiliensis</i>	S/R	S/R	S/R	-	S	S
	<i>A. luchuensis</i>	S/R	S/R	S/R	-	S	S
	<i>A. uvarum</i>	S	S	S	S	S	S
Flavi	<i>A. tamaritii</i>	S	S	S	-	S	S
	<i>A. nomius</i>	S/R	S	S	-	R	-
	<i>A. arachidicola</i>	S	S	S	-	-	-
	<i>A. transmontanensis</i>	S	S	S	-	-	-
	<i>A. alliaceus</i>	S	S	S	-	R	R
	<i>A. cealatus</i>	S	S	S	-	R	S
<i>A. minisclerotigenes</i>	-	S	S	-	I	S	
Terrei	<i>A. hortai</i>	S	S	S	S	S/R	S
	<i>A. carneus</i>	S	S	S	-	S	-
	<i>A. alabamensis</i>	S	S	S	S	R	S
	<i>A. citrinoterreus</i>	S	S	S	S	R	S
	<i>A. floccosus</i>	-	-	-	-	R	-
<i>A. neoafricanus</i>	-	-	-	-	R	-	
Nidulantes	<i>A. rugulosus</i>	S	S	S	-	S	S
	<i>A. unguis</i>	R	S	-	-	-	-
	<i>A. spinulosporus</i>	S	S	S	-	S	S
	<i>A. quadrilineatus</i>	S	S	S	-	S	S
	<i>A. versicolor</i>	-	-	-	-	S	S
	<i>A. sydowii</i>	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S
	<i>A. tennesseensis</i>	S	S	S	-	-	-
	<i>A. tabacinus</i>	S/R	S/R	S/R	S/R	R	S
	<i>A. creber</i>	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S
	<i>A. amoenus</i>	S/R	S	S	-	S	S
	<i>A. protuberus</i>	S	S	R	-	S	S
	<i>A. jensenii</i>	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	S
<i>A. hongkongensis</i>	S	S	-	-	-	-	
Usti	<i>A. calidoustus</i>	R	R	R	R	S/I	S
	<i>A. insuetus</i>	R	R	R	R	S/R	-
	<i>A. kevei</i>	R	R	R	-	S	-
	<i>A. ustus</i>	R	R	R	-	R	S
	<i>A. pseudodeflectus</i>	R	R	R	R	S/R	S
	<i>A. granulatus</i>	R	R	R	-	S	S
Circumdati	<i>A. westerdijkiae</i>	S	S	S	-	R	S
	<i>A. persii</i>	S	S	R	-	R	R
	<i>A. ochraceus</i>	S/R	S	I	-	R	S
	<i>A. sclerotiorum</i>	R	R	R	-	R	S
	<i>A. pseudosclerotiorum</i>	I	S	I	-	R	S
	<i>A. subramanianii</i>	R	R	R	-	R	S
	<i>A. pseudoelegans</i>	-	S	R	-	R	S
<i>A. palidofulvus</i>	S	S	R	S	R	-	
Candidi	<i>A. candidus</i>	S	S	S	-	S	-
	<i>A. tritici</i>	S	S	S	-	S	-
	<i>A. pragensis</i>	I	I	R	-	S	-
Clavati	<i>A. clavatus</i>	S	S	S	-	-	-
	<i>A. giganteus</i>	S	S	S	-	S	-
Cremeri	<i>A. wentii</i>	S	S	S	S	R	-
Aspergillus	<i>A. pseudoglaucus</i>	S	R	S	-	R	-
	<i>A. chevalieri</i>	S	S	S	S	S	-
	<i>A. montevidensis</i>	S/R	S/R	S/R	S/R	S/R	-

Tableau 7 : Profils de sensibilité aux antifongiques des espèces cryptiques d'*Aspergillus* retrouvés dans la littérature

D'un autre côté, la problématique de l'acquisition d'une résistance par un isolat sensible, a émergé ces dernières années (113). Elle peut survenir chez les patients traités au long cours par un antifongique mais ce phénomène est très rare. La principale source d'inquiétude concerne l'acquisition de la résistance dans l'environnement sous la pression de sélection des antifongiques utilisés massivement dans l'industrie agricole et l'horticulture (114). Ainsi ces dernières années plusieurs souches d'*A. fumigatus* résistantes aux antifongiques azolés ont émergé, notamment aux Pays-Bas, et ont disséminé à travers toute la planète (Figure 17) (115).

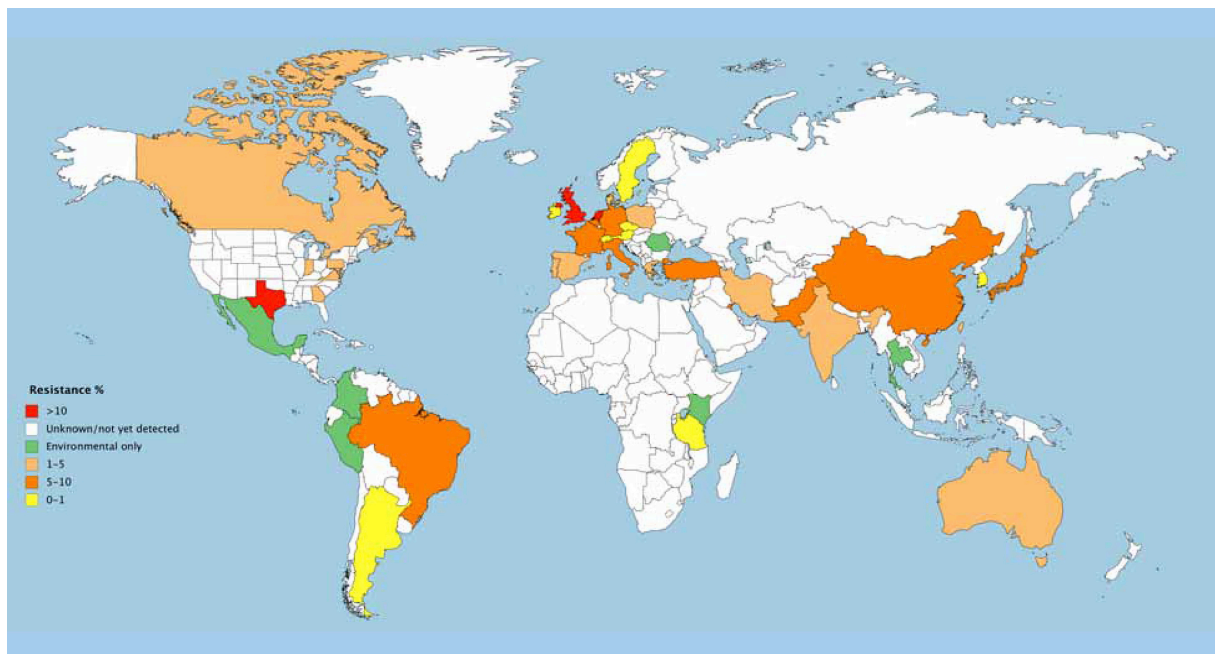


Figure 17 : Répartition mondiale des isolats résistants d'*Aspergillus fumigatus* présentant la mutation TR34/L98H (d'après Lestrade et al., *Clin Microbiol Infect*, 2019)

Des résistances acquises aux antifongiques azolés ont également été mises en évidence pour certaines espèces de la section *Nigri* ou pour *A. flavus* et *A. terreus* (116, 117). Ce phénomène n'a pas encore été décrit pour les autres espèces cryptiques mais il est tout à fait possible qu'elles soient également sujettes à l'acquisition d'une résistance à partir de l'environnement.

4.4. Mécanismes impliqués dans la résistance aux antifongiques

La résistance aux antifongiques azolés est celle qui a été le plus étudiée chez les *Aspergillus*. Parmi les différents mécanismes décrits, deux mécanismes principaux ressortent. Le premier

correspond à une modification de la cible (la lanostérol-14 α -déméthylase ou Cyp51). L'antifongique ne pourra plus se lier à l'enzyme qui conservera donc son activité métabolique. Cette modification du Cyp51 est liée à des mutations au niveau du gène *cyp51a* codant pour l'enzyme cible (118). De nombreuses mutations du gène *cyp51a* ont ainsi été mises en évidence, principalement chez *A. fumigatus*, conférant une résistance croisée à tous les antifongiques azolés ou à une seule molécule en particulier. Certaines mutations du *cyp51a* ont également été observées chez *A. niger*, *A. tubingensis*, *A. flavus* et *A. terreus*, permettant d'expliquer la résistance observée (Tableau 8) (117).

Espèces	Mutations	Antifongiques touchés
<i>A. fumigatus</i>	G545, -W, -E, -K Y121F G138C, -S P216L F219I, -C, -S M220V, -K, -T, -I A284T Y431C, -S G432S G434C G448S TR34/L98H TR46/Y121F/T289A TR53	Itraconazole et/ou posaconazole Voriconazole Itraconazole, posaconazole, voriconazole Itraconazole, posaconazole Itraconazole, posaconazole Itraconazole et/ou posaconazole et/ou voriconazole Itraconazole, posaconazole, voriconazole Posaconazole, voriconazole et/ou itraconazole Itraconazole Itraconazole, posaconazole, voriconazole Itraconazole, voriconazole Itraconazole, posaconazole, voriconazole Voriconazole Itraconazole, voriconazole
<i>A. flavus</i>	Y132N/T469S K197N K197N/D282E/M288L R450S	Voriconazole Voriconazole Voriconazole Voriconazole
<i>A. niger</i>	V104I H382R I377V/S507I/L511M	Itraconazole Itraconazole Itraconazole, voriconazole
<i>A. tubingensis</i>	L21F A9V/L21F/A140V/P413S/D505E T321A A185G/T321A/N327S/V422/L492M /I503F/Q504P	Itraconazole et/ou posaconazole Itraconazole Voriconazole Itraconazole, voriconazole
<i>A. terreus</i>	M217T, -V, -I	Posaconazole et/ou itraconazole

Tableau 8 : Liste par espèce, des mutations de la protéine CYP51a associées à une résistance aux antifongiques azolés (d'après Perez-Cantero et al., IJAA, 2020)

Le deuxième mécanisme correspond à une surexpression de la cible. Cette surexpression a été corrélée à la présence de séquences répétées en tandem (ou *tandem repeats* TR) dans le promoteur du gène *cyp51a*. Des TR de 34 (TR34), 46 (TR46) et 53 paires de bases (TR53) ont été mis en évidence dans des isolats d'*A. fumigatus* résistants aux antifongiques azolés. C'est la combinaison de ces deux mécanismes (modification et surexpression de la cible) qui a été identifiée comme étant responsable de la résistance acquise à partir de l'environnement des souches d'*A. fumigatus* qui se sont répandues sur toute la planète. Plusieurs combinaisons ont ainsi été observées, et notamment TR34/L98H ou TR46/Y121/T289A (119).

A côté de ces deux mécanismes principaux, d'autres ont également été évoqués pour expliquer la résistance aux azolés. Parmi ceux-ci, des pompes d'efflux permettant de faire sortir de l'antifongique avant qu'il n'ait exercé son activité, ont été associées à une résistance chez *A. fumigatus*. Les principaux transporteurs impliqués sont *cdr1b* et *mdr1* de la famille des ABC (*ATP binding cassette*) et *mdrA* de la famille des MFS (*major facilitator superfamily*) (120, 121). Enfin, des mutations au niveau du gène *hmg1* codant pour l'HMG-CoA reductase impliquée dans la première étape de la synthèse de l'ergostérol, ont récemment été associées à une résistance aux antifongiques azolés, sans altération de la protéine Cyp51A chez *A. fumigatus*. Les mutations F262del, S305P et I412S du gène *hmg1* semblent particulièrement intéressantes (122).

Concernant les autres espèces cryptiques résistantes aux antifongiques azolés, peu de données existent. Il a été montré au niveau de la séquence du *cyp51a* d'*Aspergillus calidoustus* (naturellement résistant aux azolés) la présence d'une valine en position 220, qui correspond à la mutation M220V de *A. fumigatus* lui conférant une résistance acquise aux antifongiques azolés (118). Pour *A. lentulus*, Mellado et al. ont montré que la résistance aux azolés observée pouvait être liée au gène *cyp51a*. Après avoir introduit un *cyp51a* de *A. lentulus* dans une souche sensible d'*A. fumigatus* déplétée en *cyp51a*, cette dernière a exprimé une résistance aux antifongiques azolés (123). Cependant des études récentes n'ont pas réussi à corréler la résistance aux azolés de *A. thermomutatus*, *A. udagawae* ou de *A. felis* à des mutations au niveau du *cyp51a* (106, 124).

Concernant la résistance à l'amphotéricine B, elle a surtout été étudiée chez *A. terreus* et semblerait impliquer une résistance au stress oxydatif induit par l'antifongique, bien que le

mécanisme ne soit pas complètement élucidé (125). Peu de données existent concernant les autres espèces.

Bien que de nombreux isolats d'espèces cryptiques d'*Aspergillus* aient montré une résistance à un ou plusieurs antifongiques, les mécanismes impliqués restent donc pour la plupart d'entre eux inconnus.

Problématiques – Objectifs

Les aspergilloses humaines, toutes formes confondues, représentent donc une problématique de santé importante. Pendant de nombreuses années, les connaissances concernant les aspergilloses se sont focalisées sur cinq espèces majeures : *A. fumigatus* principalement, puis *A. flavus*, *A. niger*, *A. terreus* et *A. nidulans*. Cependant, l'évolution récente de la taxonomie et l'amélioration des outils d'identification des *Aspergillus* a permis la mise en évidence d'un nombre croissant d'espèces dites cryptiques. Bien que minoritaires par rapport à *A. fumigatus*, ces espèces représentent désormais une part non négligeable des *Aspergillus* impliquées en pathologie humaine. Certaines de ces espèces sont d'autant plus importantes qu'elles présentent des caractéristiques particulières, comme une résistance naturelle aux antifongiques, et sont pathogènes pour l'Homme. Cependant les données les concernant, notamment en termes d'écologie, de sensibilité aux antifongiques ou de pouvoir pathogène, restent à ce jour parcellaires. Plusieurs raisons l'expliquent. Tout d'abord, la description de certaines espèces cryptiques en tant qu'espèces à part entière est relativement récente. Par conséquent, très peu de données rétrospectives sont disponibles pour ces espèces. Deuxièmement, leur identification en routine reste difficile et l'obtention précise de l'espèce n'est pas toujours possible. Des imprécisions concernant l'identification peuvent donc être retrouvées dans certaines études. Enfin, les données concernant la sensibilité aux antifongiques sont généralement obtenues sur de faibles effectifs et avec des méthodes différentes d'une étude à l'autre. Ceci ne permet pas d'établir un profil de sensibilité par espèce et peut être à l'origine de discordances observées entre les études.

Au-delà de ces problématiques, il existe très peu d'études complètes menées sur un grand nombre d'isolats cryptiques combinant l'implication clinique et les données microbiologiques d'identification et de sensibilité aux antifongiques.

L'application MSI, développée par le Professeur Piarroux et le Docteur Normand, permet l'identification d'un large panel de champignons à partir de leurs spectres de masse. Ces spectres sont acquis par spectrométrie de masse de type MALDI-TOF, dont l'utilisation s'est répandue en pratique de routine dans les laboratoires de microbiologie. L'application MSI a récemment été mise en ligne (1^{er} août 2017) et présente l'avantage de posséder la plus grande

base de données de spectres de masse d'espèces d'*Aspergillus*. Elle fournit une identification gratuite, aisée et précise des espèces cryptiques d'*Aspergillus* à de nombreux utilisateurs (44 centres 4 mois après le lancement). L'objectif de cette étude est d'utiliser les données de fonctionnement de l'application MSI afin de détecter facilement l'identification d'une espèce cryptique parmi le réseau d'utilisateurs. Le réseau de microbiologistes constitué représente un des avantages indéniables de cette étude. Il permettra de récolter un grand nombre d'isolats de ces espèces, qui restent tout de même rares, et de collecter leurs données épidémiologiques. L'analyse microbiologique des isolats récoltés, dont la mesure de la sensibilité aux antifongiques, pourra ensuite être effectuée par des techniques de référence, afin d'éviter les variations méthodologiques. La mise en commun de toutes ces données permettra ainsi une analyse globale des espèces cryptiques, combinant implication clinique et données microbiologiques. Ceci ayant pour finalité, l'acquisition de meilleures connaissances écologiques, épidémiologiques et microbiologiques sur les espèces cryptiques d'*Aspergillus* afin d'améliorer la prise en charge des patients présentant une forme d'aspergillose liée à ces espèces.

Matériels et méthodes

1. Collecte et conservation des isolats

A partir d'août 2017, et jusqu'en octobre 2019, les données d'identification obtenues par les utilisateurs de l'application MSI ont été étudiées de façon hebdomadaire. Ainsi, à chaque fois qu'un des utilisateurs ayant accepté de participer au projet identifiait une espèce cryptique d'*Aspergillus*, il était contacté afin qu'il conserve l'isolat puis qu'il le fasse parvenir au laboratoire de parasitologie et mycologie de l'hôpital de La Pitié Salpêtrière. Dès que le nombre d'isolats collectés pour une espèce donnée a été jugé suffisant, l'inclusion pour cette espèce a été stoppée afin d'éviter une surreprésentation des espèces les plus fréquentes.

A leur réception au laboratoire, chaque isolat a été repiqué sur un milieu de Sabouraud, pour vérifier sa pureté et sa viabilité. En cas de culture pure et viable, chaque isolat a ensuite été référencé et conservé à -20°C en tubes Microbank (Pro-Lab Diagnostics) contenant des microbilles et un cryoconservateur.

2. Identification des isolats

2.1. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

2.1.1. Acquisition des spectres

L'acquisition des spectres de masse des isolats d'*Aspergillus* reçus, est effectuée sur un spectromètre de masse MALDI-TOF Microflex (Bruker), après un protocole standardisé d'extraction des protéines (126). Pour cela, chaque isolat est ensemencé sur une gélose Sabouraud contenant de la gentamicine et du chloramphénicol. Dès que possible, une petite quantité de colonie est récupérée en grattant précautionneusement à l'aide d'un scalpel, d'une aiguille ou d'une anse en plastique de 1 µl stérile, en prenant garde de ne pas contaminer le prélèvement avec de la gélose. Le matériel récolté est ensuite suspendu dans un microtube de 1,5 ml contenant un mélange de 300 µl d'eau pure de grade HPLC (*high performance liquide chromatography*) et de 900 µl d'éthanol absolu. Le microtube est ensuite centrifugé une première fois à 13 000 g pendant 2 minutes. Après centrifugation, le surnageant est éliminé

par retournement, et le microtube est centrifugé une deuxième fois dans les mêmes conditions. Afin d'obtenir un culot complètement sec, le surnageant restant est éliminé par aspiration à l'aide d'une pipette de 100 µl, puis le microtube est laissé à l'air libre quelques minutes. Après évaporation complète du surnageant, le culot est resuspendu dans 25 µl d'acide formique à 70 %. Après 5 minutes d'incubation, 25 µl d'acétonitrile pur est ajouté dans le microtube. Après une nouvelle incubation de 5 minutes, le microtube est centrifugé pendant 2 minutes à 13 000 g. Quatre réplicats de 1 µl de surnageant sont déposés sur quatre spots de la plaque en acier réutilisable du MALDI-TOF. Une fois sec, chaque spot est recouvert rapidement par 1 µl de suspension de matrice HCCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid). Une fois la matrice sèche, la plaque est insérée dans le Microflex pour acquérir les spectres de masse. Les spectres ainsi acquis peuvent ensuite être analysés selon plusieurs logiciels et bases de données pour obtenir une identification, ou être utilisés pour incrémenter des bases de données.

2.1.2. Analyse des spectres et identification

Les spectres acquis sur le Microflex sont d'abord analysés avec le logiciel MALDI Biotyper (MBT) de Bruker sur les deux bases de données IVD-CE et *Filamentous Fungi Library 3.0*. Avec ce logiciel, la comparaison des spectres aboutit à un score sur une échelle logarithmique allant de 0 à 3. Les critères fournisseur d'interprétation de ce score sont :

- supérieur à 2,3 : haute probabilité d'identification à l'espèce
- entre 2 et 2,3 : identification assurée du genre, probable identification de l'espèce
- entre 1,7 et 2 : probable identification du genre
- inférieur à 1,7 : pas d'identification fiable

Les spectres bruts peuvent également être récupérés et analysés selon l'algorithme et la base de données en ligne MSI, dans sa première version (<https://biological-mass-spectrometry-identification.com>). La comparaison aboutit à un score sur une échelle allant de 0 à 100. Un score supérieur à 20 est considéré comme représentatif d'une probable identification à l'espèce, entre 17 et 20 l'identification est probable au genre et enfin un score inférieur à 17 ne permet pas une identification fiable (27).

Au cours de l'étude, une nouvelle version de l'application MSI a été développée (<https://msi.happy-dev.fr>), suivant les mêmes critères de validité d'identification que la première version.

Les échantillons étant déposés sur quatre spots différents à chaque fois, il est possible d'obtenir plusieurs identifications pour un même isolat. Dans ce cas-là, c'est l'identification obtenue avec le meilleur score qui est considérée.

2.2. Identification moléculaire par séquençage ADN

2.2.1. Extraction de l'ADN

Pour effectuer l'extraction d'ADN, les isolats à identifier sont mis en culture sur milieu de Sabouraud (ThermoFisher). Une fois les colonies suffisamment développées, deux méthodes différentes ont été utilisées. La première est une extraction manuelle utilisant le kit QIAamp DNA Blood Mini (Qiagen) précédée d'une lyse mécanique par le MagNA Lyser (Roche) et une lyse chimique par la protéinase K. Les colonies sont récupérées en les grattant délicatement à l'aide d'un scalpel ou d'une anse stérile, puis sont transférées dans un tube MagNA Lyser Green Beads (Roche) contenant 800 µl de tampon ATL (Qiagen). Une fois les colonies dans le tampon, il est possible de les conserver à -20°C plusieurs jours avant la suite de l'extraction. Après décongélation, les tubes sont ensuite soumis à 3 cycles d'agitation de 30 secondes sur le MagNA Lyser, puis sont incubés toute une nuit à 56°C avec 50 µl de protéinase K. L'ADN est ensuite extrait en suivant le protocole du kit QIAamp DNA Blood, avec un volume final d'élution de 100 µl.

La deuxième méthode d'extraction utilisée est une extraction semi-automatisée sur l'automate easyMAG (bioMérieux) sans lyse mécanique préalable. Les colonies sont transférées dans un microtube de 1,5 ml contenant 800 µl de tampon de lyse easyMAG (à base de guanidine thyocyanate) et laissées à température ambiante jusqu'à l'extraction (de quelques heures à plusieurs jours). L'ADN est extrait en suivant le protocole d'extraction de l'easyMAG, avec un volume de silice de 50 µl et un volume final d'élution de 50 µl.

Les éluats d'ADN obtenus avec les 2 méthodes d'extraction sont conservés à -20°C.

2.2.2. Amplification et séquençage de l'ADN

Les deux régions d'ADN d'intérêt qui ont été choisies pour l'identification précise des *Aspergillus*, correspondent à une partie du gène *benA* codant pour la β-tubuline et une partie du gène *cmd* codant pour la calmoduline. Ces deux régions sont d'abord par *polymerase chain reaction* (PCR), en utilisant les couples d'amorces spécifiques bt2a/bt2b pour le gène *benA* et

cmd5/cmd6 ou CL1/CL2a en fonction de la section, pour le gène *cmd*. Les séquences des amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 9 (20).

Gènes	Amorces	Séquences
Beta tubuline (<i>benA</i>)	bt2a	GGT AAC CAA ATC GGT GCT GCT TTC
	bt2b	ACC CTC AGT GTA GTG ACC CTT GGC
Calmoduline (<i>cmd</i>)	cmd5	CCG AGT ACA AGG ARG CCT TC
	cmd6	CCG ATR GAG GTC ATR ACG TGG
	CL1	GAT ATC AAG GAG GCC TTC TC
	CL2a	TTT TTG CAT CAT GAG TTG GAC

Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour l'identification moléculaire par séquençage (d'après Samson et *al.*, *Stud Mycol*, 2014)

Le mélange réactionnel de PCR est préparé en ajoutant les amorces choisies au mélange « tout en un » LightCycler 480 *probes master* (Roche). Ce mélange est distribué dans une plaque 96 puits, dans laquelle les différents ADN à amplifier seront répartis. Les concentrations, les volumes et les protocoles de PCR d'amplification sont les mêmes pour les 3 couples d'amorces utilisés et sont présentés dans le Tableau 10.

Réactifs	Concentration initiale	Volume pour une PCR sous 33,5µl		Temps	Température
H2O	-	19 µl	Dénaturation initiale Cycles Dénaturation Hybridation Elongation Elongation finale Terminaison	10min	95°C
Mix LC 480	2X	13,75 µl		x40	
Amorce sens	10µM	0,375 µl		30sec	95°C
Amorce antisens	10µM	0,375 µl		30sec	55°C
				1min	72°C
				10min	72°C
				∞	12°C

Tableau 10 : PCR d'amplification : mélange réactionnel (gauche) et programme de PCR (droite)

La réussite de l'amplification de la région d'intérêt est vérifiée en faisant migrer une partie des produits de PCR par électrophorèse sur un gel d'agarose à 2%. L'ajout de GelRed au gel d'agarose permet de visualiser l'ADN amplifié après excitation du gel à 312 nm par le transilluminateur ChemiDoc XRS (Biorad). En cas d'amplification satisfaisante, la totalité des produits de PCR est ensuite purifiée par ultrafiltration mécanique sur plaque 96 puits NucleoFast (Machery-Nagel) et conservée à -20°C jusqu'au séquençage.

Le séquençage est effectué selon la méthode de Sanger. Deux PCR de terminaison de chaîne sont réalisées pour chaque produit d'amplification purifié, en utilisant l'amorce « sens » dans l'une des réactions et l'amorce « anti-sens » dans l'autre. Ceci permet d'obtenir la séquence des deux brins complémentaires. Le mélange réactionnel de la PCR de terminaison de chaîne est préparé en ajoutant l'amorce choisie au mélange « tout en un » *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems), contenant notamment les didesoxyribonucléotides marqués. Ce mélange est distribué dans une plaque 96 puits dans laquelle sera ajouté l'ADN à séquencer. Les concentrations, les volumes et les protocoles de la PCR de terminaison de chaîne sont les mêmes pour les 6 amorces utilisées et sont présentés dans le Tableau 11.

Réactifs	Concentration initiale	Volume pour une PCR sous 19,3µl		Temps	Température
H2O	-	14 µl	Dénaturation initiale	2min	95°C
BigDye Terminator	2X	2 µl	Cycles	x25	
Sequencing buffer	5X	3 µl	Dénaturation	10sec	95°C
Amorce	10µM	0,3 µl	Hybridation	5sec	50°C
			Elongation	4min	60°C
			Terminaison	∞	12°C

Tableau 11 : PCR de séquençage : mélange réactionnel (gauche) et programme de PCR (droite)

Les produits issus de la PCR de terminaison de chaîne sont ensuite purifiés en microplaque contenant de la résine Chelex (Biorad) puis insérés sur le séquenceur 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems). Ils sont séparés en fonction de leur taille par électrophorèse capillaire. La lecture de l'électrophorégramme résultant permet l'obtention de la séquence du fragment d'ADN amplifié. L'analyse des électrophorégrammes et l'alignement des séquences complémentaires est effectuée à l'aide du logiciel ChromasPro v1.7.1 (Technelysium Pty Ltd.).

2.2.3. Analyse et identification des séquences d'ADN

L'identification des séquences ADN obtenues est effectuée par analyse phylogénétique pour chaque section, en incluant les séquences des souches type de chacune des espèces d'*Aspergillus*. A cette fin, toutes les séquences de référence ont été récupérées sur le site Genbank à partir de leur numéro d'accès fourni sur le site

www.aspergilluspenicillium.org, ou directement à partir des publications pour les espèces décrites ultérieurement (Annexe 1).

Les séquences des isolats à identifier au sein d'une même section sont d'abord alignées avec les séquences de référence de la section en question, à l'aide du programme *Muscle* inclus dans le logiciel MEGA X. La séquence d'une espèce proche mais ne faisant pas partie de la même section est également ajoutée à l'alignement afin de servir d'*outgroup* pour l'analyse. Pour chaque alignement, un arbre phylogénétique est construit par la méthode du maximum de vraisemblance avec 1000 répliques de *bootstraps* et en utilisant le modèle GTR, à l'aide du logiciel MEGA X. L'analyse phylogénétique a été effectuée pour chaque gène individuellement ou en concaténant les séquences des portions des deux gènes séquencés.

3. Tests de sensibilité aux antifongiques

3.1. Microdilution en milieu liquide

La mesure des CMI a été effectuée selon la méthode de référence de microdilution en milieu liquide de l'EUCAST pour les champignons filamenteux (vE.DEF 9.3.1), pour les 4 antifongiques azolés (l'itraconazole, le voriconazole, le posaconazole et l'isavuconazole) et l'amphotéricine B (93).

3.2.1. Préparation des milieux et des plaques de microdilution

Le milieu servant à la réalisation de ce test de sensibilité est du RPMI (*Roswell Park Memorial Institute*) 1640 à 2 % de glucose, tamponné par de l'acide 3-(N-morpholino) propansulfonique (MOPS). Il doit être préparé à une concentration de 2X afin d'obtenir une concentration finale adéquate après distribution de l'inoculum. Pour cela, 20,8 g de RPMI 1640 en poudre, 69,06 g de MOPS et 36 g de glucose sont solubilisés dans 900 ml d'eau stérile. Le pH est ensuite ajusté à 7.0 en ajoutant de l'hydroxyde de sodium, puis le volume est complété jusqu'à 1000 ml par de l'eau stérile. La solution de RPMI 2X ainsi préparée est stérilisée par ultrafiltration avec un filtre de 0,22 µm, puis conservée à -20°C 6 mois au maximum.

Les plaques de microdilution contenant les gammes d'antifongiques peuvent également être produites à l'avance. Pour cela, une solution stock pour chaque antifongique à tester est tout d'abord préparée, à une concentration de 1,6 g/l pour l'itraconazole et le posaconazole et de 3,2 g/l pour le voriconazole, l'isavuconazole et l'amphotéricine B, en solubilisant l'antifongique en poudre (Pfizer pour l'isavuconazole et Sigma-Aldrich pour les 4 autres antifongiques) dans du diméthylsulfoxyde (DMSO). Elles ont ensuite été aliquotées par 500 µl en microtubes puis conservées à -80°C jusqu'à leur utilisation. Au moment de la préparation des plaques, une gamme de dilution de raison 2 dans du DMSO est réalisée à partir d'une aliquote de solution stock, pour chaque antifongique. Chaque point de la gamme est ensuite dilué au 1/100^e dans du RPMI 1640 2X. La gamme ainsi obtenue est distribuée par rangée dans une plaque 96 puits à fond plat, en disposant 100 µl par puits, selon le schéma de la Figure 18. Deux colonnes sont remplies avec du RPMI 2X uniquement, sans antifongique, pour servir de témoin de croissance et de témoin de contamination. Les plaques sont ensuite conservées à -20°C jusqu'à leur utilisation, pour un 1 mois maximum.

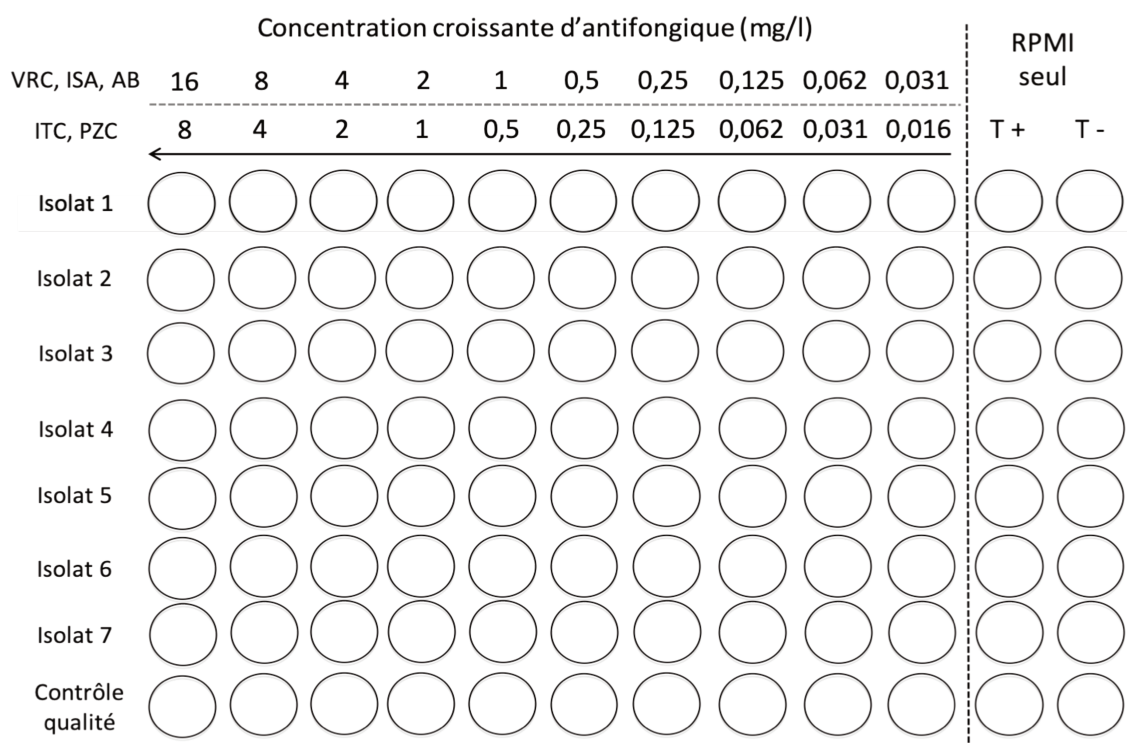


Figure 18 : Schéma d'une plaque de microdilution en milieu liquide pour la détermination des concentrations minimales inhibitrices par la méthode EUCAST

3.2.2. Préparation de l'inoculum et réalisation du test

Pour la préparation de l'inoculum, l'isolat à tester est repiqué sur une gélose de Sabouraud et incubé jusqu'à la production suffisante de conidies (entre 2 jours et 2 semaines selon les espèces). Les conidies sont récupérées en frottant la colonie fongique avec un écouvillon humide, qui est ensuite déchargé dans un tube stérile contenant 2 ml d'une solution de Tween 20 à 0,1%. Les conidies sont ensuite comptées en cellule de Kova et la suspension est ajustée avec de l'eau distillée jusqu'à obtenir une concentration de 2 à 5 x10⁶ conidies/ml. Cette suspension est ensuite diluée au 1/10^e dans de l'eau distillée pour obtenir l'inoculum final.

L'inoculation des plaques de microdilution est réalisée en distribuant 100 µl d'inoculum final dans chaque puits selon le schéma de la Figure 18. Sur chaque plaque, la dernière ligne est inoculée alternativement par une des trois souches de contrôle qualité suivantes : *C. parapsilosis* ATCC 22019, *C. krusei* ATCC 6258 ou *A. fumigatus* ATCC 204305. Ceci permet de vérifier la qualité de la préparation de la plaque de microdilution, selon les CMI attendues pour ces 3 souches (127). A noter qu'une colonne n'est inoculée qu'avec de l'eau distillée pour servir de témoin de contamination. Après inoculation, les concentrations finales en antifongique dans les plaques vont de 0,015 à 8 mg/l pour l'itraconazole et le posaconazole et de 0,03 à 16 mg/l pour le voriconazole, l'isavuconazole et l'amphotéricine B.

Les plaques sont incubées à 35°C pendant 48 heures, ou à 30°C pour les espèces ne se développant pas à 35°C. La lecture des CMI s'effectue ensuite visuellement à l'aide d'un miroir inversé ou d'un papier noir et blanc placé sous la plaque (93). La CMI est considérée comme la concentration du premier puits dans lequel aucun trouble n'est visible à l'œil nu.

3.2. Diffusion en milieu gélosé

Pour certains isolats, les CMI ont également été mesurées en utilisant des bandelettes à gradient de concentration (Liofilchem pour l'isavuconazole et E-test [Biomérieux] pour l'itraconazole, le voriconazole, le posaconazole et l'amphotéricine B). Cette méthode nécessite également l'utilisation de géloses RPMI prêtes à l'emploi (Biomérieux).

L'inoculum de l'isolat à tester est préparé de la même manière que pour la méthode de microdilution, sauf que la suspension finale est ajustée à une turbidité de 0,5 McFarland. L'inoculum est ensuite étalé sur la gélose RPMI à l'aide d'un écouvillon imbibé de la suspension et d'un touret sur lequel est disposée la gélose. Les bandelettes des 5 antifongiques

à tester sont disposées sur la gélose qui est incubée à 35°C. La lecture des CMI a été effectuée après 48 et 72 heures d'incubation, à l'intersection entre la bandelette et l'ellipse à 100 % d'inhibition (aucune colonie visible).

4. Collecte des informations sur les isolats

Les informations concernant les isolats inclus dans l'étude ont été récupérées de manière prospective et anonyme par les utilisateurs, au moment des envois. Pour cela, un code d'anonymisation a été attribué à chaque isolat et un fichier standardisé de recueil des données a été envoyé à chaque centre ayant accepté de participer à l'étude.

Le premier item à renseigner est l'origine environnementale ou clinique de l'isolat. S'il s'agit d'un isolat clinique, le type de prélèvement, l'âge, le sexe, la pathologie sous-jacente et la pathologie aspergillaire suspectée sont également demandés.

Pour les isolats suspectés d'être responsables d'une infection invasive, un formulaire plus complet a été envoyé spécifiquement. Ce formulaire présenté en Annexe 2, permet de récupérer des informations plus précises sur les facteurs de risque, les caractéristiques de la pathologie, son traitement et son évolution. Toutes les informations ont ensuite été conservées dans un fichier anonymisé sécurisé.

Résultats : Identification des espèces cryptiques – Article 1

Entre août 2017 et octobre 2019, 15305 isolats d'*Aspergillus* ont été identifiés par l'application MSI, dont 4602 isolats d'espèces cryptiques. Cent douze centres répartis dans 19 pays ont identifié au moins une espèce cryptique (entre 1 et 455 selon les centres), avec une moyenne de 41 isolats cryptiques par centre. Parmi ces centres, 14 utilisateurs ont participé à l'étude et sont, par ordre décroissant du nombre d'isolats transmis : le CHU de Bordeaux, le CHU de Rouen, le CHU La Pitié Salpêtrière (APHP, Paris), le CHU de Toulouse, le CHU Bichat (APHP, Paris), le laboratoire BioParisOuest (Levallois-Perret), le CHU de Nice, le CHU de Saint Etienne, le CHU Saint Antoine (APHP, Paris), l'hôpital universitaire d'Aarhus (Danemark), le CHU Avicenne (APHP, Bobigny), le CHU de Cayenne et la société *de Watergroep* (Belgique). La collaboration avec ces 14 centres a permis de récupérer au total 390 isolats cryptiques pendant la période d'étude (Figure 19).

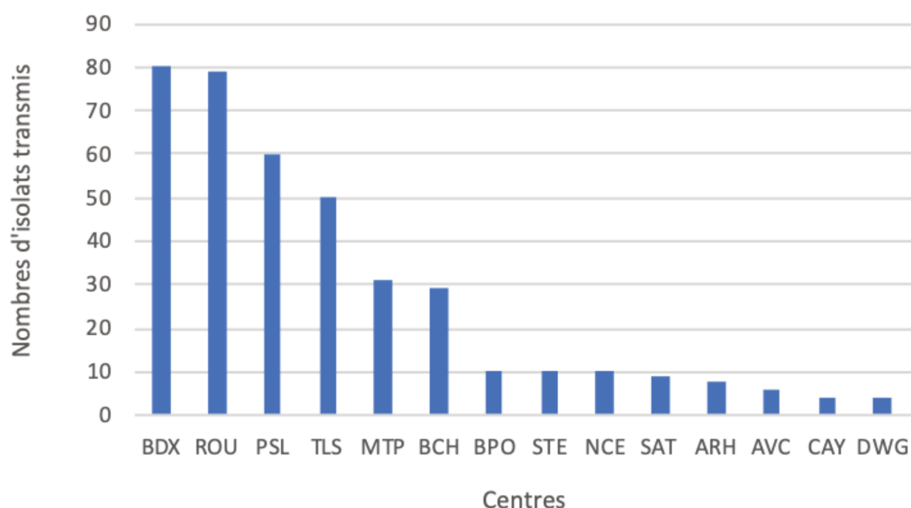


Figure 19 : Répartition des isolats transmis en fonction des centres participants

(BDX : Bordeaux, ROU : Rouen, PSL : Pitié Salpêtrière, TLS : Toulouse, MTP : Montpellier, BCH : Bichat, BPO : BioParisOuest, STE : Saint Etienne, NCE : Nice, SAT : Saint Antoine, ARH : Aarhus, AVC : Avicenne, CAY : Cayenne, DWG : de Watergroep)

Après identification moléculaire par séquençage partiel des gènes *benA* et *cmd*, les 390 isolats se répartissent en 69 espèces cryptiques différentes appartenant à 13 sections (Tableau 12). Les arbres phylogénétiques de chaque section ayant permis l'identification sont présentés en Annexes 3 à 16.

Sections	Nidulantes (n=128)	Nigri (n=53)	Circumdati (n=52)	Fumigati (n=51)	Aspergillus (n=28)	Usti (n=23)	Flavi (n=21)
Espèces	<i>A. sydowii</i> (n=34)	<i>A. welwitschiae</i> (n=31)	<i>A. sclerotiorum</i> (n=17)	<i>A. hiratsukae</i> (n=12)	<i>A. montevidensis</i> (n=17)	<i>A. calidoustus</i> (n=18)	<i>A. alliaceus</i> (n=12)
	<i>A. latus</i> (n=30)	<i>A. tubingensis</i> (n=10)	<i>A. westerdijkiae</i> (n=13)	<i>A. cf. thermomutatus</i> (n=11)	<i>A. intermedius</i> (n=4)	<i>A. pseudodefectus</i> (n=3)	<i>A. parasiticus</i> (n=4)
	<i>A. creber</i> (n=14)	<i>A. luchuensis</i> (n=5)	<i>A. persii</i> (n=5)	<i>A. lentulus</i> (n=9)	<i>A. pseudoglaucus</i> (n=3)	<i>A. puniceus</i> (n=1)	<i>A. tamaritii</i> (n=3)
	<i>A. jensenii</i> (n=13)	<i>A. brunneoviolaceus</i> (n=2)	<i>A. insulicola</i> (n=5)	<i>A. thermomutatus</i> (n=7)	<i>A. ruber</i> (n=2)	<i>A. insuetus</i> (n=1)	<i>A. nomius</i> (n=1)
	<i>A. tabacinus</i> (n=7)	<i>A. piperis</i> (n=2)	<i>A. ochraceus</i> (n=5)	<i>A. felis</i> (n=4)	<i>A. chevalieri</i> (n=2)		<i>A. pseudonomius</i> (n=1)
	<i>A. puulaauensis</i> (n=7)	<i>A. neoniger</i> (n=2)	<i>A. ochraceopetaliformis</i> (n=4)	<i>A. udagawae</i> (n=4)			
	<i>A. spinulosporus</i> (n=6)	<i>A. brasiliensis</i> (n=1)	<i>A. subramanianii</i> (n=1)	<i>A. fischeri</i> (n=3)			
	<i>A. unguis</i> (n=4)		<i>A. affinis</i> (n=1)	<i>A. tsurutae</i> (n=1)			
	<i>A. amoenus</i> (n=4)		<i>A. ostianus</i> (n=1)				
	<i>A. protuberus</i> (n=3)						
	<i>A. quadrilineatus</i> (n=1)						
	<i>A. versicolor</i> (n=1)						
	<i>A. venenatus</i> (n=1)						
	<i>A. corrugatus</i> (n=1)						
<i>A. pepii</i> (n=1)							
<i>A. hongkongensis</i> (n=1)							
Sections	Terrei (n=18)	Candidi (n=4)	Clavati (n=4)	Restricti (n=3)	Flavipedes (n=3)	Cremeri (n=2)	
Espèces	<i>A. cf. alabamensis</i> (n=5)	<i>A. tritici</i> (n=2)	<i>A. rhizopodus</i> (n=2)	<i>A. caesiellus</i> (n=3)	<i>A. izukae</i> (n=3)	<i>A. europaeus</i> (n=2)	
	<i>A. alabamensis</i> (n=4)	<i>A. candidus</i> (n=1)	<i>A. clavatus</i> (n=1)				
	<i>A. citrinoterreus</i> (n=3)	<i>A. subalbidus</i> (n=1)	<i>A. giganteus</i> (n=1)				
	<i>A. aureoterreus</i> (n=3)						
	<i>A. floccosus</i> (n=2)						
<i>A. neoindicus</i> (n=1)							

Tableau 12 : Répartition des espèces cryptiques identifiées par séquençage en fonction des sections

Cependant, les résultats d'identification moléculaire ont rapidement montré l'existence de certaines discordances avec l'identification proposée par l'application MSI. Pour le premier article de la thèse, nous avons donc décidé d'évaluer les performances de l'application MSI pour l'identification des espèces cryptiques d'*Aspergillus*. Nous avons également analysé les causes d'erreur afin de les corriger lors de la mise en place de la deuxième version de l'application qui était alors en cours de développement. Ce travail a été effectué à partir des 245 premiers isolats cryptiques reçus, issus de 11 centres, auxquels nous avons ajoutés 51 isolats non cryptiques provenant des mêmes centres.

*Article n°1 : Multicentric evaluation of the online
MSI platform for the identification of cryptic and rare
species of Aspergillus by MALDI-TOF*

Medical Mycology
Publié (Novembre 2019)



Original Article

Multi-centric evaluation of the online MSI platform for the identification of cryptic and rare species of *Aspergillus* by MALDI-TOF

Sébastien Imbert^{1,2,3,*}, Anne Cécile Normand¹, Frédéric Gabriel⁴,
Sophie Cassaing⁵, Christine Bonnal⁶, Damien Costa⁷, Laurence Lachaud⁸,
Lilia Hasseine⁹, Lise Kristensen¹⁰, Christine Schuttler¹¹, Hélène Raberin¹²,
Sophie Brun¹³, Marijke Hendrickx¹⁴, Dirk Stubbe¹⁴, Renaud Piarroux^{1,3,15}
and Arnaud Fekkar^{1,2,3}

¹AP-HP, Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Parasitologie Mycologie, F-75013 Paris, France, ²Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, CIMI-Paris, F-75013 Paris, France, ³Sorbonne Université, AP-HP, Hôpital Pitié-Salpêtrière, F-75013 Paris, France, ⁴Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Service de Parasitologie Mycologie, F-33000, Bordeaux, France, ⁵Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Service de Parasitologie Mycologie, F-31059, Toulouse, France, ⁶AP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Service de Parasitologie Mycologie, F-75018 Paris, France, ⁷Centre Hospitalier Universitaire de Rouen, Service de Parasitologie Mycologie, F-76000, Rouen, France, ⁸Centre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Service de Parasitologie Mycologie, F-34000, Montpellier, France, ⁹Centre Hospitalier Universitaire de Nice, Service de Parasitologie Mycologie, F-06000, Nice, France, ¹⁰Aarhus University Hospital, Department of Clinical Microbiology, DK-8200, Aarhus N, Denmark, ¹¹Laboratoire Biogroup-LCD, F-92300, Levallois, France, ¹²Centre Hospitalier Universitaire de Saint Etienne, Service de Parasitologie Mycologie, F-42100, Saint Etienne, France, ¹³AP-HP, Hôpital Avicenne, Service de Parasitologie Mycologie, F-93000 Bobigny, France, ¹⁴Service of Mycology and Aerobiology, BCCM/IHEM Fungal collection, Scientific Institute of Public Health, B-1050, Brussels, Belgium and ¹⁵Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, INSERM, F-75013 Paris, France

*To whom correspondence should be addressed. S. Imbert, PharmD, PhD student, Service de Parasitologie-Mycologie, Hôpital de La Pitié-Salpêtrière, 47–83 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris, France. Tel: +33 1 42 16 01 50; Fax: +33 1 42 16 01 65; E-mail: sebastien.imbert@aphp.fr

Received 31 October 2018; Revised 4 January 2019; Accepted 8 January 2019; Editorial Decision 7 January 2019

Abstract

The taxonomy of *Aspergillus* species has recently been revolutionized with the introduction of cryptic species and section concepts. However, their species-level identification in routine laboratories remains a challenge. The aim of this study was to prospectively assess the identification accuracy of cryptic species of *Aspergillus* in various laboratories using the mass spectrometry identification (MSI) platform, an independent and freely accessible online mass spectrometry database. Over a 12-month period, when a select set of MSI users identified cryptic species, they were contacted and requested to send the isolates to our laboratory for sequence-based identification. Sequence and MSI identification results were then compared. During the study period, 5108 *Aspergillus* isolates were identified using MSI including 1477 (28.9%) cryptic species. A total of 245 isolates that corresponded to 56 cryptic species and 13 sections were randomly selected for DNA sequencing confirmation. Agreement between the two methods was 99.6% at the section level and 66.1% at the species level. However, almost all discrepancies (72/83, 86.7%) were misidentifications between closely related cryptic species belonging to the same section. Fifty-one isolates from noncryptic

species were also identified, thus yielding 100% and 92.2% agreement at the section and species level, respectively. Although the MSI fungus database is a reliable tool to identify *Aspergillus* at the section level, the database still requires adjustment to correctly identify rare or cryptic species at the species level. Nevertheless, the application properly differentiated between cryptic and sensu stricto species in the same section, thus alerting on possible specific isolate characteristics.

Key words: *Aspergillus*, species complex, mass spectrometry, cryptic species.

Introduction

Aspergillus species represent the most frequent filamentous fungus implicated in human pathology.¹ In recent years, *Aspergillus* species taxonomy has been revolutionized by the application of DNA sequencing and the polyphasic approach to describe new species.² As a result, the new concepts of cryptic species and the section (or species complex) have emerged.³ Species of the same section are nondistinguishable by morphological characteristics. The term cryptic species represents species belonging to the same section.

Currently, the *Aspergillus* genus includes 379 recognized species belonging to 26 sections (<https://aspergilluspenicillium.org/aspergillus-naam>).² It is important to note that the former sections *Versicolores* and *Nidulantes* were recently assembled in the same *Nidulantes* section.⁴ Although the implication of these “new” or formerly misidentified species in human disease remains largely unclear, more than 50 species have already been described in human samples,^{5–8} and recent studies have reported a prevalence of such species at approximately 10–15% of clinical isolates.^{9,10} Moreover, several retrospective studies have shown that numerous clinical isolates have been misidentified, especially inside the *Nigri* and *Usti* sections.^{11–13} Nevertheless, accurate species identification is a major clinical issue, as some related species might present different antifungal susceptibility pattern. For example, *A. lentulus*, and *A. thermomutatus*, which are very close to *A. fumigatus* and belong to the *Fumigati* section, are all resistant to voriconazole,^{14–16} the first-line treatment for invasive aspergillosis.¹⁷

Therefore, accurate and easy-to-perform identification of *Aspergillus* species found in clinical samples is essential to improve management of patients suffering from aspergillosis. Such findings would also shed light on clinical, epidemiological, and antifungal susceptibility characteristics of these poorly understood species.

Identification of these species in the routine laboratory setting remains a challenge. Morphology-based identification, which is used by a majority of microbiology laboratories, cannot generally be applied to distinguish different cryptic species of the same section. Sequence-based identification, which involves sequencing portions of the beta tubulin and calmodulin genes, represents the gold standard method. However, as such sequencing techniques are time consuming, expensive, and only feasible in specialized laboratories, DNA sequencing cannot be universally applied in routine settings.²

Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry has revolutionized the identification of microbiological agents and is suitable for identification of filamentous fungi such as *Aspergillus* species.^{18,19} However, identification quality directly relies on the scope of the database utilized. Commercial databases dedicated to filamentous fungus identification often fail to provide relevant mould identification as they usually include very few cryptic species.²⁰

The mass spectrometry identification (MSI) platform (available since July 2016 at <https://biological-mass-spectrometry-identification.com/msi/welcome>) is an independent and freely accessible online database dedicated to the identification of various parasitic and fungal pathogenic agents, from their mass spectra acquired by Bruker® MALDI-TOF Microflex.^{21,22} The fungus database built in collaboration with the BCCM/IHEM (Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms/Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology) hosts 11851 references that correspond to 1913 strains of yeast and filamentous fungi, which represent 246 genera and 938 species.²¹ The database includes 166 different *Aspergillus* species. Currently, 104 laboratories from 28 different countries are listed users of the MSI platform.

In this report, we evaluate the accuracy of mass spectrometry-based identification of cryptic species of *Aspergillus* using the MSI platform in a multicentric and prospective study.

Methods

MSI-based identification

Each participating center used the latest version (July 2017) of the MSI platform. To obtain the best results, each participant followed a standardized extraction protocol, that is, protein extraction with formic acid and acetonitrile, and subsequent identification in quadruplicate.²³

Briefly, isolates were harvested, the earliest possible, by scrapping gently a small amount of the colony with a sterile plastic device or a needle and then transferred in a mix of 300 μ l of sterile water and 900 μ l of anhydrous ethylic alcohol, in a sterile 1.5 ml tube. Tubes were vortexed and centrifugated (13000 g, 2 min). Supernatant was removed by reversal of the tube. To allow a complete removal of the supernatant, tubes were centrifugated another time (13000 g, 2 min), and the remaining supernatant was removed with a pipette. After the complete evaporation of the supernatant (approximately

2 min), the pellet was resuspended in 25 μ l of 70% formic acid by pipetting and incubated 5 min. Then, 25 μ l of 100% acetonitrile was added and incubated 5 min, before centrifugation (13000 g, 2 min). 1 μ l of supernatant was then deposited on a spot of the target and covered, when totally dry, with 1 μ l of the matrix solution. Spectra acquired were then uploaded on the MSI platform. A score above or equal to 20 (on a scale of 0 to 100) was considered adequate for accurate identification at the species level.²¹

Isolate collection and sequence-based identification

Over the course of a 12-month period (August 2017–July 2018), we contacted 11 different MSI platform users each time they identified a cryptic or rare *Aspergillus* species via mass spectrometry (score above the cutoff of 20), that is, any *Aspergillus* species aside from *A. fumigatus*, *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans*, and *A. terreus*, for the shipment of the isolate to the parasitology-mycology laboratory at La Pitié-Salpêtrière Hospital, a tertiary care center in Paris, France, for subsequent sequence-based identification. The participating centers were selected for the study because they identified most, if not all, isolates of filamentous fungus using the MSI platform, thus limiting a bias toward rare or difficult-to-identify species. The centers involved in the study were located in France (Paris area [$n = 4$], Bordeaux, Rouen, Montpellier, Nice, Saint-Etienne and Toulouse) and Denmark (Aarhus). The centers involved were either university hospitals ($n = 10$) or nonhospital laboratories ($n = 1$). Of note, as we quickly obtained a sufficient number of *A. tubingensis* and *A. welwitschiae* isolates for sequence-based identification, we ceased reception of such isolates for our sample cohort early on during the study. In addition, some isolates identified as sensu stricto species by the MSI platform, were randomly collected and sent to our laboratory to be used as controls. All isolates recovered were preserved in collection and included in the study.

DNA sequence-based identification was conducted by sequencing a part of the beta-tubulin and calmodulin genes using the primer pairs Bt2a/Bt2b for beta-tubulin and CL1/CL2A or cmd5/cmd6 for calmodulin, as previously described.² The resulting DNA sequences were analyzed using ChromasPro v1.7.1 (Technelysium Pty Ltd). Identification was performed by establishing maximum likelihood trees that were built using the Kimura two-parameter model with 1000 bootstrap replications. While building the maximum likelihood trees, sequences of type-strains for each species inside the section studied were included. Phylogenetic analyses were performed for each gene individually and/or with the concatenated sequences of the two genes, when available, using MEGA 6.0 software, for each section. The obtained sequences of isolates of interest included in the study were deposited on Genbank (accession numbers MK297710–MK297892 and MK297532–MK297699).

Comparison of MSI platform and sequence-based identification results

For each sample, the MSI identification obtained with a score above or equal to 20, as reported by the participating center, was considered the MSI identification result for subsequent comparison. If several identification results were proposed for the same specimen, only the result with the best score was retained. The identification results obtained with the MSI platform were then compared to the DNA sequence identification results.

Results

MSI platform data

During the study period, 77740 spectra were submitted to the fungal database by 80 of the 104 users. A total of 5108 different *Aspergillus* isolates were identified with a score above 20, of which 3631 isolates (71.1%) belonged to one of the five major sensu stricto species: 2,661 *A. fumigatus*, 541 *A. flavus*, 199 *A. terreus*, 146 *A. niger*, and 84 *A. nidulans*. Meanwhile, 1477 isolates (28.9%) corresponded to 94 different cryptic or rare species in 13 sections (Fig. 1A/1B). Of note, *A. tubingensis* ($n = 214$) and *A. welwitschiae* ($n = 164$) from the *Nigri* section were more frequently found than *A. niger*. In the *Nidulantes* section, *A. sydowii* ($n = 123$) was more frequent than *A. nidulans*.

DNA sequence-based identification

Among the 1477 isolates identified as cryptic species by all the MSI-platform users, 245 isolates (16.6%) were randomly sent to our laboratory by the 11 participating centers for DNA sequence-based identification (mean of 22 isolates per center; range: 6–55). Fifty-one isolates identified as non-cryptic species by the MSI platform were also collected from these 11 centers. According to the identification obtained from the MSI platform, the 245 isolates corresponded to 55 cryptic or rare species belonging to 13 sections (Fig. 1C). The most represented sections included the *Nidulantes* section (76 isolates), the *Nigri* section (47 isolates), and the *Fumigati* section (35 isolates).

The majority of isolates originated from clinical samples (232/245; 94.7%), while the remaining isolates originated from environmental samples. Sequence-based identification yielded a slightly greater degree of diversity with 56 identified cryptic or rare species.

Comparison of MSI and sequence-based identification results

Regarding the identification of cryptic or rare species at the section level, agreement between the sequencing and MSI approaches reached 99.6% (244/245 isolates). The single discrepancy corresponded to an *A. unguis* isolate (*Nidulantes* section)

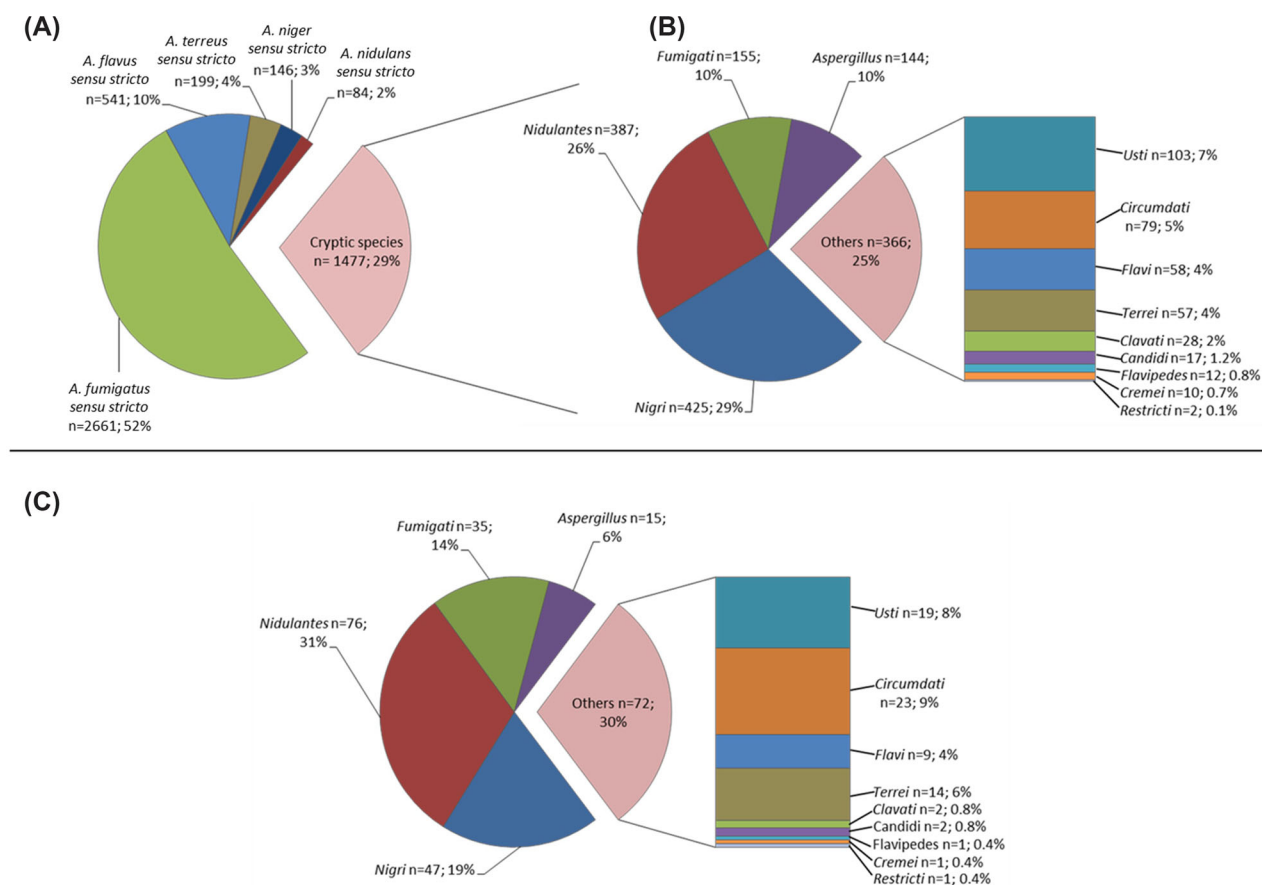


Figure 1. *Aspergillus* species repartition. A, B: Repartition of all isolates identified in MSI during the study period (A: five main *Aspergillus* species; B: rare or cryptic species according to the section). C: Repartition of isolates included in the study for sequence-based identification, according to the section. This Figure is reproduced in color in the online version of *Medical Mycology*.

that was misidentified as *A. ustus* (*Usti* section) by mass spectrometry. Agreement was lower concerning identification at the species level (66.1% [162/245]). Most discrepancies (72/83, 86.7%) were misidentifications between closely related cryptic species belonging to the same section.

Discordances between the two methods are listed in Table 1. The *Nidulantes* section displayed the most discrepancies (38/76, 50%), especially the *A. nidulans* clade (0/25), which was mainly due to the identification of three species that were systematically misidentified by the MSI platform: *A. delacroixii* (three isolates), *A. echinulatus* (15 isolates), and *A. quadrilineatus* (seven isolates). To note, inside this section, results were better for the other clades (74.5%) including *A. versicolor* clade. Likewise, *A. aureoluteus* (nine isolates, *Fumigati* section), *A. persii* (eight isolates, *Circumdati* section), and *A. insuetus* (six isolates, *Usti* section) were systematically misidentified by the MSI platform. These misidentifications yielded a relatively low agreement between the two methods for these sections with rates of 62.9%, 52.2%, and 63%, respectively. By contrast, agreement was markedly greater for the sections *Nigri* (93.6%), *Aspergillus* (93.3%) and *Flavi* (88.9%). Concerning the 51

noncryptic species, agreement between the MSI and sequence results was 100% for identification at the section level and 92.2% for identification at the species level (47/51). The MSI platform identified three isolates of *A. welwitschiae* as *A. niger* and one *A. citrinoterreus* isolate as *A. terreus*.

Discussion

Aspergillus taxonomy has been dramatically transformed in recent years, thus rendering identification at the species level a challenge for medical mycologist. Nevertheless, accurate species identification is essential to improve patient management and the understanding of these new species.

To the best of our knowledge, this study involves the largest series of cryptic *Aspergillus* species samples to be assessed via mass spectrometry. The sample cohort included 245 cryptic isolates belonging to 56 species, with a mean of four isolates per species (range: 1–28). Repartition of isolates recovered corresponded to the diversity profile of all isolates identified in the MSI database over the course of the study period, with the exception of the *Nigri* section, which was underrepresented

Table 1. Discrepancies observed and causes of misidentification between MSI and sequence-based identifications. All identifications are correct at the section level, except.*

Causes of misidentifications (<i>n</i> ; % of all misidentifications)	MSI identification	Sequence-based identification	Other potential issues	
Absent from the MSI database (<i>n</i> = 23; 27.7%)	<i>A. echinulatus</i> (<i>n</i> = 11)	<i>A. latus</i> (<i>n</i> = 11)	Changes in taxonomy: disappearance of the species <i>A. echinulatus</i>	
	<i>A. delacroxii</i> (<i>n</i> = 3)	<i>A. latus</i> (<i>n</i> = 3)	Changes in taxonomy: disappearance of the species <i>A. delacroxii</i>	
	<i>A. quadrilineatus</i> (<i>n</i> = 4)	<i>A. latus</i> (<i>n</i> = 3)	Misidentification of isolates used to generate the reference spectra	
	<i>A. aureoluteus</i> (<i>n</i> = 1)	<i>A. corrugatus</i> (<i>n</i> = 1) <i>A. pseudofelis</i> (<i>n</i> = 1)	Changes in taxonomy: disappearance of the species <i>A. aureoluteus</i>	
	<i>A. insulicola</i> (<i>n</i> = 1)	<i>A. pseudoelegans</i> (<i>n</i> = 1)		
	<i>A. ochraceopetaliformis</i> (<i>n</i> = 1)	<i>A. pulvericola</i> (<i>n</i> = 1)		
	<i>A. thermomutatus</i> (<i>n</i> = 1)	<i>A. tsurutae</i> (<i>n</i> = 1)		
	<i>A. viridinutans</i> (<i>n</i> = 1)	<i>A. parafelis</i> (<i>n</i> = 1)		
	<i>A. persii</i> (<i>n</i> = 8)	<i>A. sclerotiorum</i> (<i>n</i> = 8)		
	Misidentification of isolates used to generate the reference spectra (<i>n</i> = 24; 28.9%)	<i>A. insuetus</i> (<i>n</i> = 6)	<i>A. calidoustus</i> (<i>n</i> = 4) <i>A. pseudodeflectus</i> (<i>n</i> = 2)	
<i>A. nishimurae</i> (<i>n</i> = 2)		<i>A. fumigatus</i> (<i>n</i> = 2)		
<i>A. aureoluteus</i> (<i>n</i> = 8)		<i>A. lentulus</i> (<i>n</i> = 4) <i>A. thermomutatus</i> (<i>n</i> = 4)		
<i>A. nidulans</i> clade (<i>n</i> = 6)		<i>A. echinulatus</i> (<i>n</i> = 3)	<i>A. nidulans</i> (<i>n</i> = 3)	Changes in taxonomy: disappearance of the species <i>A. echinulatus</i>
		<i>A. quadrilineatus</i> (<i>n</i> = 3)	<i>A. spinulosporus</i> (<i>n</i> = 2)	Misidentification of isolates used to generate the reference spectra
		<i>A. versicolor</i> clade (<i>n</i> = 12)	<i>A. creber</i> (<i>n</i> = 5)	<i>A. nidulans</i> (<i>n</i> = 1) <i>A. jensenii</i> (<i>n</i> = 3) <i>A. puulaauensis</i> (<i>n</i> = 2)
<i>A. puulaauensis</i> (<i>n</i> = 5)			<i>A. creber</i> (<i>n</i> = 4) <i>A. jensenii</i> (<i>n</i> = 1)	
<i>A. protuberus</i> (<i>n</i> = 1)			<i>A. amoenus</i> (<i>n</i> = 1)	
<i>A. sydowii</i> (<i>n</i> = 1)			<i>A. griseoaurantiacus</i>	
<i>A. neoniger</i> (<i>n</i> = 2)			<i>A. welwitschiae</i> (<i>n</i> = 1) <i>A. tubingensis</i> (<i>n</i> = 1)	
<i>A. niger</i> clade (<i>n</i> = 3)	<i>A. pulverulentus</i> (<i>n</i> = 1)	<i>A. tubingensis</i> (<i>n</i> = 1)		
	Other sections (<i>n</i> = 13)	<i>A. alabamensis</i> (<i>n</i> = 3)	<i>A. terreus</i> (<i>n</i> = 3)	
		<i>A. floccosus</i> (<i>n</i> = 2)	<i>A. terreus</i> (<i>n</i> = 1) <i>A. aureoterreus</i> (<i>n</i> = 1) <i>A. subalbidus</i> (<i>n</i> = 1) <i>A. tritici</i> (<i>n</i> = 1)	
	<i>A. candidus</i> (<i>n</i> = 2)	<i>A. intermedius</i> (<i>n</i> = 1) <i>A. ochraceus</i> (<i>n</i> = 1)		
	<i>A. montevidensis</i> (<i>n</i> = 1)	<i>A. rhizopodus</i> (<i>n</i> = 1)		
	<i>A. melleus</i> (<i>n</i> = 1)	<i>A. pseudonomius</i> (<i>n</i> = 1)		
	<i>A. giganteus</i> (<i>n</i> = 1)	<i>A. iizukae</i> (<i>n</i> = 1)		
	<i>A. nomius</i> (<i>n</i> = 1)	<i>A. pseudodeflectus</i> (<i>n</i> = 1)		
	<i>A. flavipes</i> (<i>n</i> = 1)	<i>A. spinulosporus</i> (<i>n</i> = 1)		
	<i>A. calidoustus</i> (<i>n</i> = 1)			
<i>A. echinulatus</i> (<i>n</i> = 1)				
Changes in taxonomy (<i>n</i> = 1; 1.2%)	Disappearance of the <i>A. echinulatus</i> species			
Unknown cause (<i>n</i> = 1; 1.2%)	<i>A. ustus</i> (<i>n</i> = 1)*	<i>A. unguis</i> (<i>n</i> = 1)*		

in the panel. As we quickly obtained a sufficient number of *A. tubingensis* and *A. welwitschiae* isolates for sequence-based identification, we ceased reception of such isolates for our sample cohort early on during the study. These two species, as also observed for *A. sydowii* (*Nidulantes* section) and *A. calidoustus* (*Usti* section), were represented to a greater degree than the sensu stricto species of each section. Based on our finding, referring to such species as “cryptic” species should possibly be questioned.

During the study period, 28.9% of *Aspergillus* species identified using the MSI platform were identified as cryptic species, which is higher than previous studies that reported between 10 and 15% *Aspergillus* species depending on the study.^{9,10} As the centers participating in our study identified nearly all the filamentous fungus samples using the MSI platform, we presume that this high percentage of cryptic species really reflects the local epidemiology at each site. According to the participating centers, this percentage of cryptic species varied between 17% and 48% (median: 29%). Moreover, this high diversity was found in a series almost completely derived from clinical samples (94.7%), thus highlighting the clinical relevance of rapid detection and accurate identification of cryptic species.

Our findings indicate that the MSI platform is of particular interest to identify *Aspergillus* species based on sample mass spectra. Compared with sequence-based identification, the MSI platform easily identified the section, and presents a global accuracy at the species level of 66.1% for rare and cryptic species and 92.2% for noncryptic species. Given the fact that most discrepancies (86.7%) were misidentifications between closely related cryptic species inside the same section, these findings indicate that the MSI platform properly differentiate between cryptic and sensu stricto species, thus alerting on possible unusual isolate’s characteristics, that’s interesting to report by mycologist.

Some reports have reported better identification results for cryptic species using other databases.^{24,25} However, in a prospective database evaluation, Reyes et al. included only 19 cryptic isolates, all of which were *A. tubingensis* species, a relatively easy species to identify.^{26,27} For this section (i.e., *Nigri*), we also obtained good agreement with 93.6% correct identifications and without any misidentified *A. tubingensis* isolates. Masih et al. assessed only a few more cryptic isolates (45 isolates corresponding to 22 cryptic species), although they based their evaluation on pre-identified samples.²⁵ By contrast, we performed a prospective evaluation of the mass spectrometry-based identification results of a large series of cryptic *Aspergillus* species, which included very close species that are particularly difficult to differentiate, even using sequencing methods.

Certain misidentifications observed in this study are due to updates to *Aspergillus* taxonomy since the database was established, which include the discovery of new species and the fusion of other distinct species. This was especially the case for the

Nidulantes section, which represented almost one-third of the cryptic isolates (76/245) included in the study. Regarding this section, the species *A. echinulatus* ($n = 15$) and *A. delacroixii* ($n = 3$), which were identified by the MSI platform during the study period, are no longer considered separate species and the ex-type strains are currently considered synonymous with *A. spinulosporus*.⁴ This is also the case for the species *A. aureoluteus* ($n = 9$) of the *Fumigati* section, for which the ex-type strain is now synonymous with *A. aureolus* (Table 1).²⁸

Tools to identify reference strains have also improved since the database was constructed. Indeed, calmodulin and/or beta tubulin sequences of type strains were not available for all species, which might have led to misidentification of reference strains in the database. This was the case for the *A. quadrilineatus*, *A. persii*, and *A. insuetus* references, which yielded a false identification for seven, eight and six isolates respectively. Interestingly, Hubka et al. have recently noted that numerous *A. quadrilineatus* isolates described in the literature were misidentified and were in fact *A. latus*, for which the calmodulin reference sequence was still lacking.²⁹

Finally, 24 isolates included in the study corresponded to eight species that were not present in the database (*A. latus* [17 isolates]), *A. corrugatus*, *A. parafelis*, *A. pseudoelegans*, *A. pseudofelis*, *A. pulvericola*, *A. tsurutae* (one isolate each)]; these isolates were misidentified as closely related species by the MSI platform.

The obstacles encountered in this study highlight the importance of following changes in taxonomy to provide the most accurate identification. Therefore, to improve fungus identification performance, such databases should be designed as an evolving platform in which removing, renaming, and adding new references is standard procedure and simple. Online approaches driven by mycologists seem to be the most suitable solution.

Our study indicates that the MSI fungal database is a reliable application for the identification of cryptic species of *Aspergillus* at the section level. Some adjustments are however required to correctly perform identification at the species level. Timely adjustment of the reference spectrum library is needed to keep pace with changes in *Aspergillus* taxonomy and ultimately provide an application that will support improved understanding of cryptic species of *Aspergillus*.

Acknowledgments

We gratefully acknowledge Coralie Reilles, Martine Palous, and Isabelle Meyer for their technical assistance in isolates collection and identification.

This work has been partially presented at the congress of the French Society of Medical Mycology (SFMM) in Nice (May 2018).

Funding

This work was supported by internal funding.

Declaration of interest

The authors report no conflict of interest. The authors alone are responsible for the content and the writing of the paper.

References

- Segal BH. Aspergillosis. *N Engl J Med*. 2009; 360: 1870–1884.
- Samson RA, Visagie CM, Houbraken J et al. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*. 2014; 78: 141–173.
- Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice. *Ann N Y Acad Sci*. 2012; 1273: 18–24.
- Chen AJ, Frisvad JC, Sun BD et al. *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): polyphasic taxonomy, chemistry and biology. *Stud Mycol*. 2016; 84: 1–118.
- Hubka V, Kubatova A, Mallatova N et al. Rare and new etiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterized by molecular sequencing. *Med Mycol*. 2012; 50: 601–610.
- Gautier M, Normand AC, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clin Microbiol Infect*. 2016; 22: 662–669.
- Negri CE, Goncalves SS, Xafranski H et al. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 3633–3640.
- Siqueira JPZ, Wiederhold N, Gene J et al. Cryptic *Aspergillus* from clinical samples in the USA and description of a new species in section *Flavipedes*. *Mycoses*. 2018; 61: 814–825.
- Balajee SA, Kano R, Baddley JW et al. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *J Clin Microbiol*. 2009; 47: 3138–3141.
- Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Pelaez T et al. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother*. 2013; 57: 3380–3387.
- Hendrickx M, Beguin H, Detandt M. Genetic re-identification and antifungal susceptibility testing of *Aspergillus* section *Nigri* strains of the BCCM/IHEM collection. *Mycoses*. 2012; 55: 148–155.
- Varga J, Houbraken J, Van Der Lee HA et al. *Aspergillus calidoustus* sp. nov., causative agent of human infections previously assigned to *Aspergillus ustus*. *Eukaryot Cell*. 2008; 7: 630–638.
- Alastruey-Izquierdo A, Cuesta I, Houbraken J et al. In vitro activity of nine antifungal agents against clinical isolates of *Aspergillus calidoustus*. *Med Mycol*. 2010; 48: 97–102.
- Sugui JA, Peterson SW, Figat A et al. Genetic relatedness versus biological compatibility between *Aspergillus fumigatus* and related species. *J Clin Microbiol*. 2014; 52: 3707–3721.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A et al. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother*. 2008; 52: 1244–1251.
- Howard SJ. Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species. *Mycopathologia*. 2014; 178: 435–439.
- Ullmann AJ, Aguado JM, Arikan-Akdagli S et al. Diagnosis and management of *Aspergillus* diseases: executive summary of the 2017 ESCMID-ECMM-ERS guideline. *Clin Microbiol Infect*. 2018; 24: e1–e38.
- Seng P, Drancourt M, Gouriet F et al. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*. 2009; 49: 543–551.
- Gautier M, Ranque S, Normand AC et al. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clin Microbiol Infect*. 2014; 20: 1366–1371.
- Normand AC, Cassagne C, Gautier M et al. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiol*. 2017; 17: 25.
- Normand AC, Becker P, Gabriel F et al. Validation of a new web application for identification of fungi by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol*. 2017; 55: 2661–2670.
- Lachaud L, Fernandez-Arevalo A, Normand AC et al. Identification of leishmania by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry using a free web-based application and a dedicated mass-spectral library. *J Clin Microbiol*. 2017; 55: 2924–2933.
- Cassagne C, Ranque S, Normand AC et al. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS One* 2011; 6: e28425.
- Vidal-Acuna MR, Ruiz-Perez de Pipaon M, Torres-Sanchez MJ et al. Identification of clinical isolates of *Aspergillus*, including cryptic species, by matrix assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS). *Med Mycol*. 2018; 56: 838–846.
- Masih A, Singh PK, Kathuria S et al. Identification by molecular methods and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry and antifungal susceptibility profiles of clinically significant rare *Aspergillus* species in a referral chest hospital in Delhi, India. *J Clin Microbiol*. 2016; 54: 2354–2364.
- Gautier M, Normand AC, L'Ollivier C et al. *Aspergillus tubingensis*: a major filamentous fungus found in the airways of patients with lung disease. *Med Mycol*. 2016; 54: 459–470.
- D'Hooge E, Becker P, Stubbe D et al. Black aspergilli: a remaining challenge in fungal taxonomy? *Med Mycol*. 2018. doi: 10.1093/mmy/myy124.
- Novakova A, Hubka V, Dudova Z. et al. New species in *Aspergillus* section *Fumigati* from reclamation sites in Wyoming (USA) and revision of *A. viridinutans* complex. *Fungal Diversity*. 2014; 64: 253–274.
- Chrenkova V, Hubka V, Cetkovsky P et al. Proven invasive pulmonary aspergillosis in stem cell transplant recipient due to *Aspergillus sublatus*, a cryptic species of *A. nidulans*. *Mycopathologia*. 2018; 183: 423–429.

Ce travail a montré que la première version de l'application MSI était capable de différencier l'espèce *sensu stricto* des autres espèces de la section avec une grande fiabilité. Cela en fait un outil puissant pour détecter une espèce cryptique d'*Aspergillus* par rapport à l'espèce *sensu stricto*, et confirme son utilité pour notre étude. Cependant, au niveau de la distinction des espèces cryptiques entre elles, au sein d'une même section, certaines erreurs ont été mises en évidence, avec un agrément global de 66,1 % avec le séquençage. Les causes d'erreur identifiées se répartissent en trois grandes catégories : 1. une modification de taxonomie depuis la création de la base (suppression de certaines espèces, changement de nom d'une espèce), 2. la présence de références erronées dans la base et enfin, 3. l'absence de référence dans la base pour certaines espèces. Ces erreurs se concentrent principalement sur les sections *Nidulantes*, *Fumigati*, *Circumdati* et *Usti*, alors que les sections *Nigri*, *Flavi* et *Aspergillus* présentent un agrément de l'ordre de 90 %. Cette étude souligne les difficultés relatives à l'obtention d'une identification précise à l'espèce, essentiellement liées à l'évolution constante de la taxonomie des *Aspergillus*. Par conséquent, il est primordial pour un système d'identification d'être flexible et de suivre ces évolutions pour fournir le résultat le plus précis possible.

C'est en ce sens qu'a été développée la version 2 de l'application MSI, avec une possibilité de renommer, supprimer ou d'ajouter des références en fonction des évolutions de la taxonomie. Ainsi, toutes les références correspondant aux anciennes espèces *A. echinulatus*, *A. delacroixii* (section *Nidulantes*) et *A. aureoluteus* (section *Fumigati*) ont été supprimées de la version 2, car elles ne sont désormais plus considérées comme des espèces à part entière. Pour les espèces *A. insuetus* (section *Usti*), *A. persii* (section *Circumdati*) et *A. quadrilineatus* (section *Nidulantes*), les références erronées ont été supprimées tout en conservant celles bien identifiées. Les anciennes espèces *A. hollandicus* et *A. athecus* ont été renommées respectivement en *A. montevidensis* et *A. ruber* pour se conformer aux changements de taxonomie. Enfin, des références pour les espèces *A. felis*, *A. tsurutae* (section *Fumigati*), *A. sublatus*, *A. corrugatus*, *A. pepii*, *A. hongkongensis*, *A. venenatus* (section *Nidulantes*), *A. subramanianii* (section *Circumdati*), et *A. subalbidus* (section *Candidi*), qui n'étaient pas présentes dans la version 1, ont été ajoutées dans la version 2 de l'application MSI. Cette nouvelle version comporte actuellement en référence des spectres pour 162 espèces différentes d'*Aspergillus*.

Les performances de cette nouvelle version de l'application ont été vérifiées ultérieurement à partir d'un panel de spectres non inclus en référence (afin d'éviter les auto-reconnaitances), et pour lesquels l'identification moléculaire a été vérifiée. Les résultats avec ce panel montrent de bien meilleures performances pour la version 2 de l'application MSI, avec un agrément global avec le séquençage de 89,9 %, toutes sections confondues (Tableau 13). La base commerciale *Filamentous Fungi Library* 3.0 de Bruker arrive quant à elle loin derrière avec un pourcentage d'identification correcte de 20 %.

Bases de données	MSI1	MSI2	Bruker <i>Filamentous Fungi Library</i> 3.0	
Seuils de décision	20	20	1,7	2
Nombre d'isolats testés (n spectres)	109 (1384)			
Nombre de spectres avec un score > seuil (%)	1327 (95,9%)	1367 (98,7%)	654 (47,3%)	357 (25,8%)
Si seuil atteint, nombre de spectres justes à la section (%)	1327 (100%)	1367 (100%)	654 (100%)	357 (100%)
Si seuil atteint, nombre de spectres justes à l'espèce (%)	726 (54,7%)	1227 (89,9%)	133 (20,3%)	70 (19,6%)

Tableau 13 : Comparaison des performances des banques de spectres MSI1, MSI2 et *Bruker Filamentous Library* 3.0 pour l'identification des espèces cryptiques

Résultats : sensibilité aux antifongiques - Article 2

Parmi les 390 isolats cryptiques d'*Aspergillus* collectés et identifiés par séquençage, les tests de sensibilité aux antifongiques par la méthode de référence EUCAST de microdilution en milieu liquide, ont été réalisés pour 356 isolats. Les isolats non testés correspondent à ceux pour lesquels la sporulation était insuffisante pour la réalisation du test, ou à ceux de l'espèce *A. welwitschiae* (section *Nigri*) pour laquelle de nombreuses données sont déjà disponibles dans la littérature.

De manière intéressante, les résultats bruts, toutes sections et espèces confondues, montrent que les espèces cryptiques ont tendance à présenter des CMI élevées aux antifongiques azolés et à l'amphotéricine B (Figure 22). En effet, pour chaque antifongique pris individuellement, entre 40 et 50 % des isolats testés présentent une CMI supérieure au CBP de *A. fumigatus* déterminé par l'EUCAST (Tableau 14). Cependant, les CMI se répartissent sur une grande étendue de valeurs, avec des disparités importantes entre les sections. Nous avons donc, dans un second temps, analysé les résultats de CMI par section.

	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole	Isavuconazole	Amphotéricine B
Etendue des CMI (mg/l)	0,015 - > 8	0,03 - > 16	0,015 - > 8	0,03 - > 16	0,03 - > 16
CMI50 (mg/l)	1	1	0,375	1	1
CMI90 (mg/l)	> 8	6	1,5	4	> 16
Moyenne géométrique (mg/l)	1,663	1,272	0,389	1,009	1,178
Nombre > CBP (%)	145 (40,7%)	158 (44,4%)	178 (50%)	151 (42,4%)	150 (42,1%)

Tableau 14 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode de référence EUCAST pour l'ensemble des isolats cryptiques d'*Aspergillus* testés

(CMI50 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats, CMI90 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 90% des isolats, CBP : *clinical breakpoints* définis par l'EUCAST pour *A. fumigatus*)

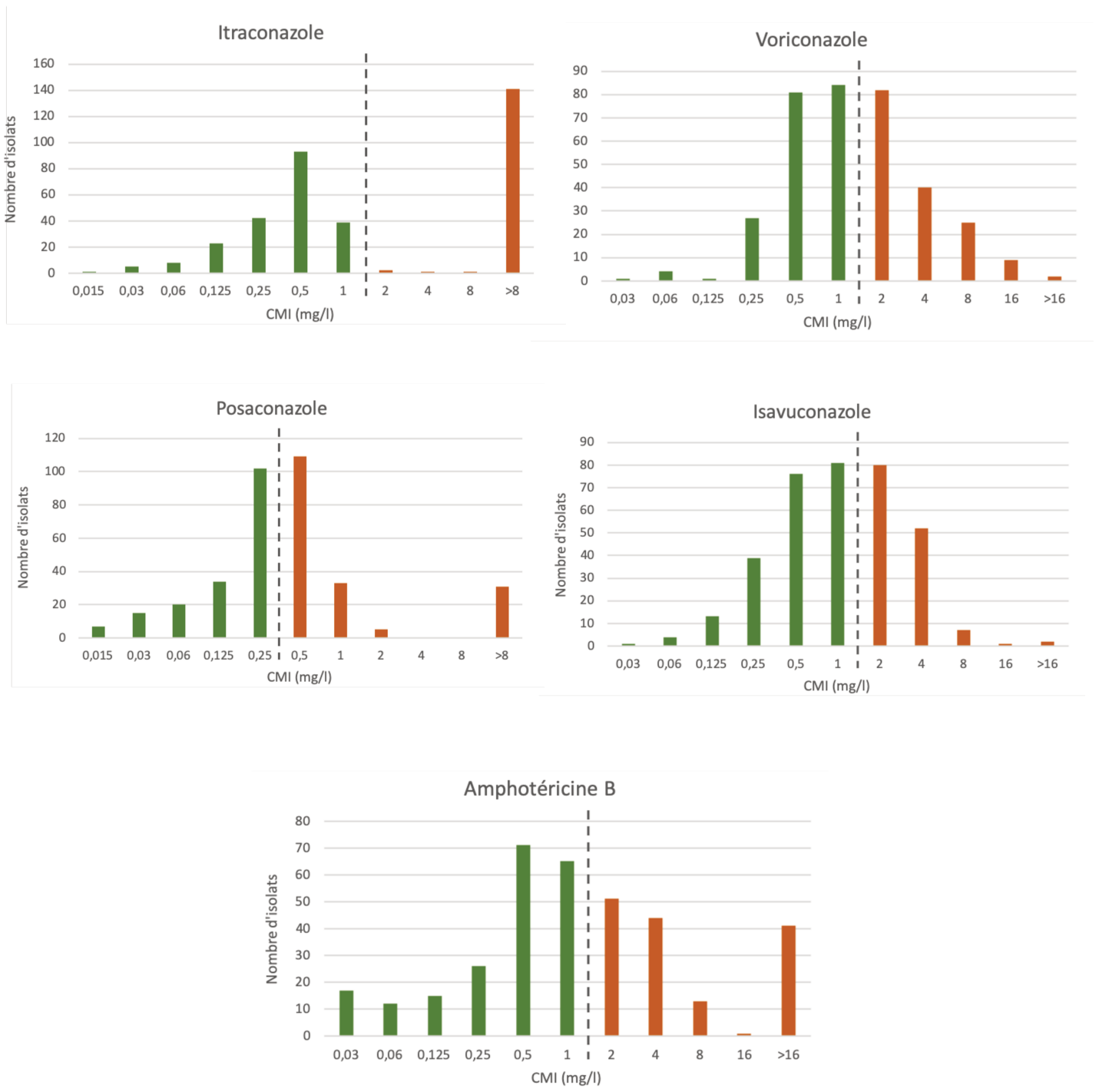


Figure 20 : Distribution des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode de référence EUCAST pour l'ensemble des isolats cryptiques d'*Aspergillus* testés, pour l'itraconazole, le voriconazole, le posaconazole, l'isavuconazole et l'amphotéricine B.

Les barres verticales en pointillés représentent les *clinical breakpoints* définis pour *A. fumigatus* par l'EUCAST

- **Section *Fumigati***

Pour le deuxième article de la thèse, nous nous sommes intéressés à la section *Fumigati*. Nous avons un nombre conséquent d'isolats cryptiques pour cette section (n=51), correspondant à 7 espèces différentes. Certaines de ces espèces sont connues pour présenter des CMI élevées et/ou ont également déjà été décrites comme responsables d'infections invasives. La connaissance des profils de sensibilité aux antifongiques dans cette section est donc d'un intérêt majeur. Nous avons également comparé les résultats des CMI obtenues par la méthode de référence en milieu liquide EUCAST, avec ceux obtenus avec des bandelettes à gradient de concentration, très utilisées dans les laboratoires de routine.

Article n°2 : Multicentric analysis of the species distribution and antifungal susceptibility of cryptic isolates from *Aspergillus* section *Fumigati*

Antimicrobial agents and chemotherapy
Accepté (septembre 2020)



Multicentric Analysis of the Species Distribution and Antifungal Susceptibility of Cryptic Isolates from *Aspergillus* Section *Fumigati*

S. Imbert^{a,b}, **A. C. Normand**^a, **S. Cassaing**^c, **F. Gabriel**^d, **L. Kristensen**^e, **C. Bonnal**^f, **L. Lachaud**^g, **D. Costa**^h, **J. Guitard**ⁱ, **L. Hasseine**^j, **M. Palous**^a, **M. Piarroux**^{a,k}, **M. Hendrickx**^l, **R. Piarroux**^{a,k}, **A. Fekkar**^{a,b}

^aAP-HP, Groupe Hospitalier La Pitié-Salpêtrière, Service de Parasitologie-Mycologie, Paris, France

^bSorbonne Université, INSERM, CNRS, Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses, Paris, France

^cCentre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Service de Parasitologie-Mycologie, Toulouse, France

^dCentre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Service de Parasitologie-Mycologie, Bordeaux, France

^eAarhus University Hospital, Department of Clinical Microbiology, Aarhus, Denmark

^fAP-HP, Hôpital Bichat-Claude Bernard, Service de Parasitologie-Mycologie, Paris, France

^gCentre Hospitalier Universitaire de Montpellier, Service de Parasitologie-Mycologie, Montpellier, France

^hCentre Hospitalier Universitaire de Rouen, Service de Parasitologie-Mycologie, Rouen, France

ⁱAP-HP, Hôpital Saint-Antoine, Service de Parasitologie-Mycologie, Paris, France

^jCentre Hospitalier Universitaire de Nice, Service de Parasitologie-Mycologie, Nice, France

^kSorbonne Université, INSERM, Institut Pierre Louis d'Epidémiologie et de Santé Publique, Paris, France

^lService of Mycology and Aerobiology, BCCM/IHEM Fungal Collection, Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium

ABSTRACT The antifungal susceptibility of *Aspergillus* cryptic species is poorly known. We assessed 51 isolates, belonging to seven *Fumigati* cryptic species, by the EUCAST reference method and the concentration gradient strip (CGS) method. Species-specific patterns were observed, with high MICs for azole drugs, except for *Aspergillus hiratsukae* and *Aspergillus tsurutae*, and high MICs for amphotericin B for *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus udagawae*. Essential and categorical agreements between EUCAST and CGS results were between 53.3 and 93.3%.

KEYWORDS *Aspergillus* section *Fumigati*, cryptic species, MALDI-TOF mass spectrometry, azole resistance, *Aspergillus thermomutatus*, *Aspergillus lentulus*, antifungal susceptibility testing

A *Aspergillus* section *Fumigati* currently includes 58 cryptic species beside *Aspergillus fumigatus*, the predominant and eponymous species of the section (1–3). The notion of cryptic species is not only of taxonomic interest, as a link between the species and the susceptibility to antifungal agents has been shown inside several sections (2, 4, 5). Moreover, these cryptic species are increasingly found in human samples (6–8), including invasive aspergillosis cases (9, 10). Nevertheless, knowledge about their antifungal susceptibility is both patchy and contradictory. Furthermore, data are mainly obtained by reference methods, and no comparisons to the widely used concentration gradient strip (CGS) method are available. Lack of data may be explained by the difficulty of collecting these species, mainly related to the issues involved in obtaining a correct identification at the species level (2, 11). The MSI application is an independent and freely accessible online database (<https://msi.happy-dev.fr>) that was built in collaboration with the Belgian Coordinated Collections of Micro-organisms/Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology (BCCM/IHEM) and includes references for 159 different *Aspergillus* species (12). The MSI application is of great interest for discriminating cryptic species from the *sensu stricto* species inside a given section (13).

Citation Imbert S, Normand AC, Cassaing S, Gabriel F, Kristensen L, Bonnal C, Lachaud L, Costa D, Guitard J, Hasseine L, Palous M, Piarroux M, Hendrickx M, Piarroux R, Fekkar A. 2020. Multicentric analysis of the species distribution and antifungal susceptibility of cryptic isolates from *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e01374-20. <https://doi.org/10.1128/AAC.01374-20>.

Copyright © 2020 American Society for Microbiology. All Rights Reserved.
Address correspondence to S. Imbert, sebastien.imbert@u-bordeaux.fr.

Received 29 June 2020

Returned for modification 11 August 2020

Accepted 3 September 2020

Accepted manuscript posted online 8 September 2020

Published

TABLE 1 *In vitro* antifungal susceptibility of 51 *Aspergillus* section *Fumigati* cryptic isolates, determined by the EUCAST method

Species and parameter	Data for ^a :				
	ITZ	VRZ	PSZ	ISA	AMB
<i>A. thermomutatus</i> (n = 18)					
MIC range (mg/liter)	>8	0.5 to 8	0.125 to 1	0.5 to 8	0.125 to 1
MIC GM (mg/liter)	>8	3.05	0.397	2.08	0.463
MIC ₅₀ (mg/liter)	>8	4	0.5	2	0.5
MIC ₉₀ (mg/liter)	>8	8	0.5	4	1
<i>A. hiratsukae</i> (n = 12)					
MIC range (mg/liter)	0.06 to 1	0.25 to 2	0.03 to 0.25	0.06 to 0.5	0.125 to 1
MIC GM (mg/liter)	0.234	0.794	0.131	0.333	0.397
MIC ₅₀ (mg/liter)	0.25	1	0.125	0.5	0.5
MIC ₉₀ (mg/liter)	1	1	0.25	0.5	1
<i>A. lentulus</i> (n = 9), MIC range (mg/liter)					
	0.5 to >8	2 to 8	0.25 to 0.5	0.5 to 4	1 to 8
<i>A. udagawae</i> (n = 4), MIC range (mg/liter)					
	2 to >8	2 to 4	0.25 to 0.5	2 to 4	1 to 8
<i>A. felis</i> (n = 4), MIC range (mg/liter)					
	>8	2 to 8	0.25 to 0.5	1 to 4	0.25 to 2
<i>A. fischeri</i> (n = 3), MIC range (mg/liter)					
	>8	2	0.25 to 0.5	2	1 to 2
<i>A. tsurutae</i> (n = 1), MIC (mg/liter)					
	0.5	1	0.125	0.5	0.25

^aGM, geometric mean; ITZ, itraconazole; VRZ, voriconazole; PSZ, posaconazole; ISA, isavuconazole; AMB, amphotericin B.

Our goal was to assess the antifungal susceptibility of cryptic species from section *Fumigati* by reference and commercial methods. The network of users of the MSI application (108 laboratories from 19 countries) allows the collection of a great number of cryptic isolates in a multicentric and prospective study.

(Part of this study was presented during the 8th Trends in Medical Mycology congress, Nice, France, 11 to 14 October 2019.)

MSI online identification data were analyzed prospectively over the course of a 27-month period (August 2017 to October 2019). During this period, nine regular MSI users were asked, when they identified a *Fumigati* cryptic species, to ship the isolate to our institution, La Pitié-Salpêtrière Hospital, a tertiary care center in Paris, France. The participating centers were university hospitals (median of 1,600 beds [range, 780 to 3,000 beds]) located in France (Paris area [n = 3], Bordeaux, Rouen, Montpellier, Nice, and Toulouse) and Denmark (Aarhus). All isolates were subjected to DNA sequencing-based identification (*benA* and *cmd* genes) (14) and antifungal susceptibility testing by the EUCAST broth microdilution (BMD) reference method (15). A selection of 30 susceptible or resistant isolates were also tested by the CGS method. MICs obtained with the CGS method were adjusted to the next upper values matching the 2-fold dilution BMD scheme. Essential agreement (EA), categorical agreement (CA), very major error (VME), and major error (ME) between CGS and BMD results were determined as described previously (16).

Over the study period, *Fumigati* cryptic species represented 364 isolates (4.6%) of the total of 7,918 *Fumigati* isolates (including 7,554 *A. fumigatus sensu stricto* isolates) identified by the MSI application. Interestingly, this cryptic species frequency within the *Fumigati* section is significantly higher than that recently published in the setting of a 14-year retrospective monocentric study, in which 14 cryptic isolates (1.4%) were recovered among 999 *Fumigati* clinical isolates (17). In this context, the MSI application appears to be a very interesting tool to give more insight into the study of rare isolates and cryptic species.

In the present study, we collected 51 *Fumigati* cryptic isolates, which represent, to the best of our knowledge, the largest collection of clinical isolates. Based on DNA sequencing identification, isolates were distributed into seven species, namely, *Aspergillus thermomutatus* (n = 18), *Aspergillus hiratsukae* (n = 12), *Aspergillus lentulus* (n = 9), *Aspergillus felis* (n = 4), *Aspergillus udagawae* (n = 4), *Aspergillus fischeri* (n = 3), and *Aspergillus tsurutae* (n = 1). With the exception of 2 environmental isolates, all isolates were recovered from clinical samples, mainly from the respiratory tract (47/49 isolates). Four isolates were related to invasive aspergillosis and 1 to a sinus fungal ball, while 42

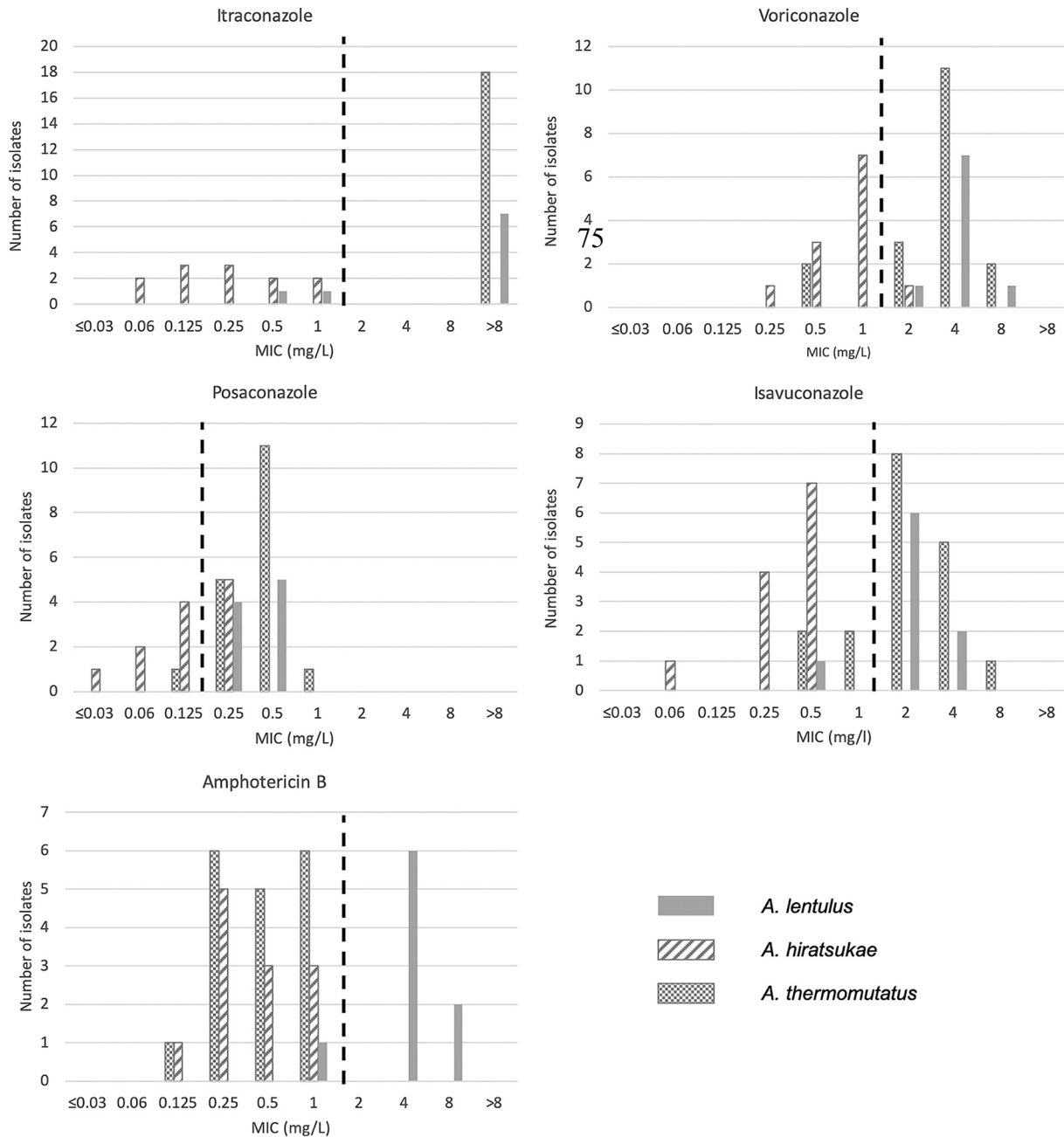


FIG 1 MIC distributions for the species *A. thermomutatus*, *A. hiratsukae*, and *A. lentulus*. Vertical dashed lines represent *Aspergillus fumigatus* clinical breakpoints.

were found as pulmonary colonizers in patients suffering from cystic fibrosis ($n = 24$) or other chronic respiratory diseases ($n = 18$). Thus, these findings highlight the importance of cryptic species in human diseases and confirm the need for accurate identification at the species level. Interestingly, the species *A. thermomutatus* was exclusively found in cystic fibrosis patients and originated mainly from two centers (Toulouse, 9 isolates [5 patients]; Aarhus, 6 isolates [3 patients]). This is consistent with previous reports in which this species (or its former teleomorph *Neosartorya pseudofischeri*) was found as a major colonizer in this disease (18, 19). However, this requires further investigations, which may be facilitated by the species' recent whole-genome sequencing (20).

MIC geometric means, MIC ranges, MIC₅₀ values, and MIC₉₀ values obtained by the

TABLE 2 Comparison between MIC values determined by the EUCAST and CGS methods for 30 *Aspergillus* section *Fumigati* cryptic isolates

Parameter and species	Data for ^a :														
	Itraconazole			Voriconazole			Posaconazole			Isavuconazole			Amphotericin B		
	EUCAST, 48 h	CGS, 48 h	CGS, 72 h	EUCAST, 48 h	CGS, 48 h	CGS, 72 h	EUCAST, 48 h	CGS, 48 h	CGS, 72 h	EUCAST, 48 h	CGS, 48 h	CGS, 72 h	EUCAST, 48 h	CGS, 48 h	CGS, 72 h
MIC (mg/liter)															
<i>A. fischeri</i>	>8	4	4	2	0.5	1	0.25	0.5	0.5	2	1	2	1	32	32
<i>A. fischeri</i>	>8	8	8	2	2	2	0.25	0.5	0.5	2	2	2	2	32	32
<i>A. hiratsukae</i>	0.125	0.008	0.03	1	0.03	0.06	0.06	0.008	0.008	0.25	0.008	0.03	0.25	0.125	0.25
<i>A. hiratsukae</i>	0.5	0.03	0.25	2	0.125	0.25	0.25	0.06	0.06	0.5	0.125	0.125	0.5	0.5	0.5
<i>A. hiratsukae</i>	0.25	0.125	0.5	1	0.25	0.5	0.125	0.06	0.125	0.25	0.25	0.25	0.25	0.5	1
<i>A. hiratsukae</i>	1	0.25	0.125	1	0.25	0.25	0.125	0.06	0.125	0.5	0.125	0.125	0.25	0.5	1
<i>A. hiratsukae</i>	0.125	0.25	0.25	1	0.5	0.5	0.125	0.06	0.125	0.5	0.125	0.5	0.25	0.5	1
<i>A. lentulus</i>	1	0.125	2	4	0.125	2	0.25	0.016	0.06	2	0.125	0.25	4	1	32
<i>A. lentulus</i>	>8	0.5	2	2	0.5	4	0.25	0.06	0.125	2	0.5	2	4	32	32
<i>A. lentulus</i>	0.5	1	32	4	2	32	0.25	0.125	0.25	2	0.5	4	1	32	32
<i>A. lentulus</i>	>8	1	32	4	2	32	0.5	0.25	0.5	2	2	32	4	32	32
<i>A. lentulus</i>	>8	1	8	8	2	8	0.5	0.125	0.25	0.5	1	1	8	32	32
<i>A. lentulus</i>	>8	2	4	4	4	32	0.25	0.125	0.5	2	2	4	4	2	32
<i>A. lentulus</i>	>8	4	32	4	32	32	0.5	0.5	0.5	4	4	8	4	32	32
<i>A. felis</i>	>8	1	2	8	2	32	0.5	0.125	0.25	4	0.5	1	0.5	4	16
<i>A. felis</i>	>8	4	4	4	2	32	0.5	0.25	0.25	1	4	16	2	4	8
<i>A. felis</i>	>8	8	32	8	8	32	0.5	0.5	0.5	4	4	32	1	4	8
<i>A. thermomutatus</i>	>8	0.5	0.5	4	0.5	2	0.25	0.125	0.25	2	0.5	0.5	0.5	1	2
<i>A. thermomutatus</i>	>8	1	1	0.5	0.5	2	0.25	0.125	0.25	0.5	0.25	0.5	0.25	1	2
<i>A. thermomutatus</i>	>8	1	2	4	1	4	0.5	0.125	0.5	1	0.5	4	1	1	1
<i>A. thermomutatus</i>	>8	1	2	8	1	2	1	0.125	0.25	4	0.5	0.5	1	1	2
<i>A. thermomutatus</i>	>8		2	4		0.25	0.5		0.03	2		0.25	1		1
<i>A. thermomutatus</i>	>8	0.25	4	2	0.5	16	0.125	0.125	0.25	2	0.125	1	0.25	1	2
<i>A. thermomutatus</i>	>8	1	4	4	1	8	0.5	0.125	0.5	2	1	2	0.125	0.125	0.25
<i>A. thermomutatus</i>	>8	1	16	4	1	16	0.5	0.25	1	2	1	4	0.25	0.125	0.25
<i>A. thermomutatus</i>	>8	1	16	4	2	8	0.5	0.5	0.5	4	2	4	0.25	0.5	1
<i>A. thermomutatus</i>	>8	1	2	2	0.5	8	0.25	0.06	0.25	2	0.125	0.5	0.5	0.5	1
<i>A. thermomutatus</i>	>8		8	4		4	0.5		0.5	4		0.25	0.5		2
<i>A. udagawae</i>	>8	0.5	4	4	2	8	0.5	0.125	0.25	2	1	2	1	32	32
<i>A. udagawae</i>	>8	1	4	4	2	16	0.5	0.125	0.5	4	2	2	2	32	32
EA within 2 dilutions (%)	NA	32.1	66.7	NA	78.6	70.0	NA	89.3	93.3	NA	78.6	73.3	NA	67.9	53.3
Spearman's rank correlation coefficient (P)	NA	0.672 (<0.0001)	0.508 (0.004)	NA	0.679 (<0.0001)	0.59 (0.0006)	NA	0.581 (0.001)	0.519 (0.003)	NA	0.545 (0.003)	0.408 (0.025)	NA	0.797 (<0.0001)	0.817 (<0.0001)
ME (%)	NA	0.0	6.7	NA	17.9	10.0	NA	0.0	3.3	NA	3.6	6.7	NA	17.9	33.3
VME (%)	NA	53.6	6.7	NA	21.4	3.3	NA	42.9	6.7	NA	42.9	26.7	NA	3.6	0.0
CA (%)	NA	46.4	86.7	NA	60.7	86.7	NA	57.1	90.0	NA	53.6	66.7	NA	78.6	66.7

^aNA, not applicable.

EUCAST BMD method are shown in Table 1. These results are in accordance with previous findings showing mainly higher MICs for cryptic species, compared with *A. fumigatus* (2, 4, 21, 22). The species *A. thermomutatus*, *A. lentulus*, *A. felis*, *A. udagawae*, and *A. fischeri* exhibited high MICs for all azole drugs, while *A. lentulus* and *A. udagawae* showed high MICs for amphotericin B. Of note, in the present study, including the largest series for *A. thermomutatus* ($n = 18$) and *A. hiratsukae* ($n = 12$), we found few MIC variations inside a given species (Fig. 1). This indicates that accurate identification at the species level could suggest the antifungal susceptibility profile. However, these findings must be strengthened through continued collection of isolates, especially for species represented by very few isolates in the present study.

Regarding the 30 isolates assessed by the CGS method, MICs were significantly correlated with those obtained by BMD (Spearman's rank correlation coefficients of >0.5 ; $P < 0.05$) (Table 2). We found moderate agreement between these two methods, with EA and CA values mainly under 90%, except for posaconazole. These results are quite different from those obtained recently with only *A. fumigatus sensu stricto* isolates, for which good agreement between the two methods was shown (23). Here, we included only *Fumigati* cryptic species characterized by low sporulation and growth rates (24). This could explain why results were particularly low after 48 h of incubation, with MICs for azole drugs being systematically lower with the CGS method ($P < 0.01$ by Wilcoxon test), as highlighted by high VME values (Table 2). When the incubation time was extended to 72 h for the CGS method (for BMD, growth was sufficient after 48 h), agreements were better for azoles but not for amphotericin B. Similar findings with the Sensititre YeastOne method were observed in a previous study focused on *Fumigati* cryptic species (21). Thus, regarding slow-growing *Fumigati* cryptic species and our results, we recommend that CGS MICs be determined after 72 h of incubation for azoles and 48 h for amphotericin B. Isavuconazole MIC determination by the CGS method is particularly open to question. The use of the *A. fumigatus sensu stricto* clinical breakpoints to categorize the isolates could also explain low CA values observed for agreement between the two methods. This supports the need to determine clinical breakpoints, or at least epidemiological cutoff values, to improve knowledge regarding these cryptic species.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by internal funding.
We declare no conflicts of interest.

REFERENCES

- Hong S-B, Shin H-D, Hong J, Frisvad JC, Nielsen PV, Varga J, Samson RA. 2008. New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 93:87–98. <https://doi.org/10.1007/s10482-007-9183-1>.
- Lamoth F. 2016. *Aspergillus fumigatus*: related species in clinical practice. *Front Microbiol* 7:683. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00683>.
- Houbraken J, Kocsubé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang X-C, Meijer M, Kraak B, Hubka V, Bensch K, Samson RA, Frisvad JC. 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (*Eurotiales*): an overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Stud Mycol* 95:5–169. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2020.05.002>.
- Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2008. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother* 52:1244–1251. <https://doi.org/10.1128/AAC.00942-07>.
- Carrara B, Richards R, Imbert S, Morio F, Sasso M, Zahr N, Normand AC, Le Pape P, Lachaud L, Ranque S, Maubon D, Piarroux R, Fekkar A. 2020. Species distribution and comparison between EUCAST and gradient concentration strips methods for antifungal susceptibility testing of 112 *Aspergillus* section *Nigri* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 67:e02510-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.02510-19>.
- Hubka V, Kubatova A, Mallatova N, Sedlacek P, Melichar J, Skorepova M, Mencl K, Lyskova P, Sramkova B, Chudickova M, Hamal P, Kolarik M. 2012. Rare and new etiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterized by molecular sequencing. *Med Mycol* 50:601–610. <https://doi.org/10.3109/13693786.2012.667578>.
- Gautier M, Normand A-C, Ranque S. 2016. Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clin Microbiol Infect* 22:662–669. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.05.013>.
- Negri CE, Goncalves SS, Xafranski H, Bergamasco MD, Aquino VR, Castro PTO, Colombo AL. 2014. Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles. *J Clin Microbiol* 52:3633–3640. <https://doi.org/10.1128/JCM.01582-14>.
- Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Rivero-Menéndez O, Ayats J, Castro C, García-Rodríguez J, Goterris-Bonet L, Ibáñez-Martínez E, Linares-Sicilia MJ, Martín-Gomez MT, Martín-Mazuelos E, Pelaez T, Peman J, Rezusta A, Rojo S, Tejero R, Anza DV, Viñuelas J, Zapico MS, Cuenca-Estrella M. 2018. Molecular identification and susceptibility testing of molds isolated in a prospective surveillance of triazole resistance in Spain (FILPOP2 Study). *Antimicrob Agents Chemother* 62:e00358-18. <https://doi.org/10.1128/AAC.00358-18>.
- Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, Andes D, Kontoyiannis DP, Perrone G, Peterson S, Brandt ME, Pappas PG, Chiller T. 2009. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *J Clin Microbiol* 47:3138–3141. <https://doi.org/10.1128/JCM.01070-09>.
- Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. 2006. Molecular studies reveal

- frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* 5:1705–1712. <https://doi.org/10.1128/EC.00162-06>.
12. Normand AC, Becker P, Gabriel F, Cassagne C, Accoceberry I, Gari-Toussaint M, Hasseine L, De Geyter D, Pierard D, Surmont I, Djenad F, Donnadiou JL, Piarroux M, Ranque S, Hendrickx M, Piarroux R. 2017. Validation of a new web application for identification of fungi by use of matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 55:2661–2670. <https://doi.org/10.1128/JCM.00263-17>.
 13. Imbert S, Normand AC, Gabriel F, Cassaigne S, Bonnal C, Costa D, Lachaud L, Hasseine L, Kristensen L, Schuttler C, Raberin H, Brun S, Hendrickx M, Stubbe D, Piarroux R, Fekkar A. 2019. Multi-centric evaluation of the online MSI platform for the identification of cryptic and rare species of *Aspergillus* by MALDI-TOF. *Med Mycol* 57:962–968. <https://doi.org/10.1093/mmy/myz004>.
 14. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong S-B, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 78:141–173. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2014.07.004>.
 15. Arendrup MC, Meletiadiis J, Mouton JW, Lagrou K, Hamal P, Guinea J. 2017. Method for the determination of broth dilution minimum inhibitory concentrations of antifungal agents for conidia forming moulds. EUCAST definitive document E.DEF 9.3.1. EUCAST. https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/AFST/Files/EUCAST_E_Def_9_3_1_Mould_testing_definitive.pdf.
 16. Dannaoui E, Paugam A, Develoux M, Chochillon C, Matheron J, Datry A, Bouges-Michel C, Bonnal C, Dromer F, Bretagne S. 2010. Comparison of antifungal MICs for yeasts obtained using the EU-CAST method in a reference laboratory and the Etest in nine different hospital laboratories. *Clin Microbiol Infect* 16:863–869. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02997.x>.
 17. Parent-Michaud M, Dufresne PJ, Fournier E, Folch B, Martineau C, Moreira S, Doucet N, De Repentigny L, Dufresne SF. 2020. Prevalence and mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Aspergillus* section *Fumigati* species in a Canadian tertiary care centre, 2000 to 2013. *J Antimicrob Chemother* 75:849–858. <https://doi.org/10.1093/jac/dkz534>.
 18. Symoens F, Haase G, Pihet M, Carrere J, Beguin H, Degand N, Mely L, Bouchara J-P. 2010. Unusual *Aspergillus* species in patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* 48(Suppl 1):S10–S16. <https://doi.org/10.3109/13693786.2010.501345>.
 19. Khare R, Gupta S, Arif S, Jentoft ME, Deziel PJ, Roden AC, Wilhelm MP, Razonable RR, Wengenack NL. 2014. Misidentification of *Neosartorya pseudofischeri* as *Aspergillus fumigatus* in a lung transplant patient. *J Clin Microbiol* 52:2722–2725. <https://doi.org/10.1128/JCM.00216-14>.
 20. Parent-Michaud M, Dufresne PJ, Fournier É, Martineau C, Moreira S, Perkins V, de Repentigny L, Dufresne SF. 2019. Draft genome sequence of azole-resistant *Aspergillus t hermomutatus* (*Neosartorya pseudofischeri*) strain HMR-AF-39, isolated from a human nasal septum abscess aspirate. *Microbiol Resour Announc* 8:e01444-18. <https://doi.org/10.1128/MRA.01444-18>.
 21. Lyskova P, Hubka V, Svobodova L, Barrs V, Dhand NK, Yaguchi T, Matsuzawa T, Horie Y, Kolarik M, Dobias R, Hamal P. 2018. Antifungal susceptibility of the *Aspergillus viridinutans* complex: comparison of two *in vitro* methods. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01927-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01927-17>.
 22. Talbot JJ, Frisvad JC, Meis JF, Hagen F, Verweij PE, Hibbs DE, Lai F, Groundwater PW, Samson RA, Kidd SE, Barrs VR, Houbraken J. 2019. *cyp51A* mutations, extrolite profiles, and antifungal susceptibility in clinical and environmental isolates of the *Aspergillus viridinutans* species complex. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00632-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.00632-19>.
 23. Dellièrè S, Verdurme L, Bigot J, Dannaoui E, Senghor Y, Botterel F, Fekkar A, Bougnoux ME, Hennequin C, Guitard J. 2019. Comparison of the MICs obtained by gradient concentration strip and EUCAST methods for four azole drugs and amphotericin B against azole-susceptible and -resistant *Aspergillus* section *Fumigati* clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e01597-19. <https://doi.org/10.1128/AAC.01597-19>.
 24. Balajee SA, Gribskov JL, Hanley E, Nickle D, Marr KA. 2005. *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell* 4:625–632. <https://doi.org/10.1128/EC.4.3.625-632.2005>.

AQ: H

Ce travail effectué sur une série d'isolats cryptiques et cliniques de la section *Fumigati* plus importante que les séries publiées à ce jour, a confirmé certaines observations antérieures montrant une part importante de CMI augmentées aux antifongiques azolés et/ou à l'amphotéricine B parmi les espèces cryptiques de cette section. Cependant ce travail a également mis en évidence des profils de CMI différents en fonction des espèces, avec peu de variations au sein d'une même espèce. Les espèces *A. lentulus* et *A. udagawae* présentent ainsi des CMI élevées aux antifongiques azolés et à l'amphotéricine B, *A. thermomutatus* des CMI élevées aux antifongiques azolés uniquement et *A. hiratsukae* des CMI basses à tous les antifongiques. Ceci souligne donc l'importance d'une identification précise de l'espèce en pratique médicale courante.

La comparaison des CMI obtenues par les deux méthodes a quant à elle montré l'intérêt de prolonger la durée d'incubation jusqu'à 72 heures pour les antifongiques azolés avec la méthode des bandelettes à gradient de concentration. Ceci permet d'obtenir une meilleure concordance avec la méthode de référence pour ces espèces cryptiques à croissance lente et de ne pas rendre à tort un isolat sensible.

- **Section *Circumdati***

La deuxième section que nous avons analysée correspond à la section *Circumdati* pour laquelle nous avons 52 isolats, dont 2 espèces (*A. sclerotiorum* et *A. westerdijkiae*) avec plus de 10 isolats chacune. Les résultats montrent des CMI élevées à l'amphotéricine B pour l'ensemble de la section (Tableau 15). Cependant, il existe des différences claires entre les espèces : *A. westerdijkiae*, *A. insulicola* et *A. ochraceopetaliformis* présentent des CMI très élevées à cet antifongique (entre 16 et > 16 mg/l), alors que pour les autres espèces (dont *A. sclerotiorum*) les CMI sont modérément hautes (entre 1 et > 16 mg/l). A l'inverse, *A. sclerotiorum* présente une *pan*-résistance aux antifongiques azolés, alors que les autres espèces (dont *A. westerdijkiae*) conservent majoritairement des CMI basses à ces antifongiques.

Espèces		Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole	Isavuconazole	Amphotéricine B
A. sclerotiorum (n=17)	Etendue (mg/l)	0 - > 8	2 - 8	0,5 - > 8	1 - 8	1 - > 16
	CMI50 (mg/l)	> 8	4	2	4	4
	CMI90 (mg/l)	> 8	8	> 8	4	8
	Moyenne géométrique (mg/l)	> 8	4,709	2,52	3,539	2,771
	n > CBP (%)	17 (100%)	17 (100%)	17 (100%)	16 (94,12%)	14 (82,35%)
A. westerdijkiae (n=13)	Etendue (mg/l)	0,25 - 1	0,5 - 2	0,25 - 1	0,25 - 2	4 - > 16
	CMI50 (mg/l)	0,5	0,5	0,5	0,5	32
	CMI90 (mg/l)	0,9	1,8	0,9	2	> 16
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,449	0,689	0,404	0,766	> 16
	n > CBP (%)	0 (0%)	2 (15,38%)	7 (53,85%)	4 (30,77%)	13 (100%)
A. insulicola (n=5)	Etendue (mg/l)	1 - 4	0,5 - 1	0,5 - 1	1 - 2	> 16
A. ochraceopetaliformis (n=4)	Etendue (mg/l)	1	1	0,5 - 1	2	16 - > 16
A. persii (n=5)	Etendue (mg/l)	0,5 - > 8	1 - 2	0,5 - 1	0,5 - 4	2 - > 16
A. ochraceus (n=5)	Etendue (mg/l)	0,5 - 1	1	0,5	1	2 - 4
A. affinis (n=1)	CMI (mg/l)	0,25	0,25	0,5	0,25	2
A. ostianus (n=1)	CMI (mg/l)	> 8	2	0,5	0,5	2
A. subramanianii (n=1)	CMI (mg/l)	> 8	4	1	4	2
Total (n=52)	Etendue (mg/l)	0,25 - > 8	0,25 - 8	0,25 - > 8	0,25 - 8	1 - > 16
	CMI50 (mg/l)	1	1	0,5	2	4
	CMI90 (mg/l)	> 8	8	> 8	4	> 16
	Moyenne géométrique (mg/l)	2,718	1,553	0,948	1,616	7,484
	n > CBP (%)	24 (46,15%)	23 (44,23%)	46 (88,46%)	32 (61,54%)	49 (94,23%)

Tableau 15 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode de référence EUCAST pour les isolats de la section *Circumdati*

(CMI50 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats, CMI90 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats, CBP : *clinical breakpoints* définis par l'EUCAST pour *A. fumigatus*)

- **Section Nidulantes**

La dernière section avec plus de 50 isolats que nous avons étudiée est la section *Nidulantes*. Il s'agit d'une section très hétérogène qui correspond à la fusion récente des deux anciennes sections *Nidulantes* et *Versicolores*. Elle est désormais divisée en 6 séries, donc les séries *Nidulantes*, *Versicolores* et *Unguium*, pour lesquels nous avons testé respectivement 38, 85 et 4 isolats. Pour cette section nous avons donc décidé d'analyser les résultats des CMI en fonction des anciennes sections, avec d'un côté la série *Nidulantes* et de l'autre les séries *Versicolores* et *Unguium*.

La série *Nidulantes* composée ici des 4 espèces *A. subblatus*, *A. spinulosporus*, *A. quadrilineatus* et *A. corrugatus*, est relativement homogène avec peu de variations et des CMI basses pour l'ensemble des antifongiques testés (Tableau 16).

		Série <i>Nidulantes</i> (n=36)	Série <i>Versicolores</i> (n=85)	Série <i>Unguium</i> (n=4)
Itraconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,25 - 1	0,06 - > 8	0,5 - > 8
	CMI50 (mg/l)	0,5	>8	>8
	CMI90 (mg/l)	0,5	>8	>8
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,402	3,369	6,727
	Nombre > CBP (%)	0 (0%)	49 (57,6%)	3 (75%)
Voriconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,25 - 1	0,25 - 4	0,25 - 0,5
	CMI50 (mg/l)	0,5	1	0,5
	CMI90 (mg/l)	0,5	2	0,5
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,424	1,067	0,420
	Nombre > CBP (%)	0 (0%)	32 (37,6%)	0 (0%)
Posaconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,125 - 0,5	0,125 - > 8	0,5 - > 8
	CMI50 (mg/l)	0,25	0,5	0,5
	CMI90 (mg/l)	0,5	1	0,85
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,317	0,468	0,595
	Nombre > CBP (%)	15 (39,5%)	61 (71,8%)	4 (100%)
Isavuconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,06 - 0,5	0,125 - 4	0,25 - 1
	CMI50 (mg/l)	0,25	1	0,75
	CMI90 (mg/l)	0,5	2	1
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,254	0,822	0,595
	Nombre > CBP (%)	9 (23,7%)	15 (17,6%)	0 (0%)
Amphotéricine B	Etendue des CMI (mg/l)	0,125 - 2	0,125 - > 16	0,5 - > 1
	CMI50 (mg/l)	0,5	2	0,75
	CMI90 (mg/l)	0,65	8	1
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,5	2,354	0,707
	Nombre > CBP (%)	1 (2,6%)	55 (64,7%)	0 (0%)

Tableau 16 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode de référence EUCAST pour les isolats de la section *Nidulantes*

(CMI50 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats,
CMI90 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 90% des isolats,
CBP : *clinical breakpoints* définis par l'EUCAST pour *A. fumigatus*)

Les deux autres séries (12 espèces) présentent quant à elles un nombre important d'isolats avec des CMI élevées à un ou plusieurs antifongiques (Tableau 16). Cependant, la série *Versicolores* est très hétérogène avec des variations importantes de CMI au sein d'une même espèce. Il n'est donc pas possible de définir un profil de CMI particulier par espèce. Ces résultats suggèrent une acquisition de résistance pour certains isolats, qui paraît relativement fréquente.

A côté de ces 3 sections pour lesquelles nous avons pu récupérer un grand nombre d'isolats, les sections *Usti*, *Aspergillus*, *Flavi*, *Nigri* et *Terrei* présentent chacune au moins 18 isolats cryptiques testés. Bien que le nombre plus faible d'isolats puisse rendre l'interprétation de CMI plus délicate, des profils particuliers apparaissent pour ces 5 sections.

- **Section *Usti***

Tous les isolats de la section *Usti* (n=23) présentent des CMI élevées à l'ensemble des antifongiques azolés et des CMI basses à l'amphotéricine B (Tableau 17). Ceci confirme les résultats antérieurs et suggère une *pan*-résistance naturelle de toute la section aux antifongiques azolés.

	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole	Isavuconazole	Amphotéricine B
Etendue des CMI (mg/l)	> 8	8 - 16	> 8	2 - 8	0,25 - 2
CMI50 (mg/l)	> 8	8	> 8	4	1
CMI90 (mg/l)	> 8	16	> 8	4	2
Moyenne géométrique (mg/l)	> 8	9,879	> 8	3,766	0,810
Nombre > CBP (%)	23 (100%)	23 (100%)	23 (100%)	23 (100%)	4 (17,4%)

Tableau 17 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode de référence EUCAST pour les isolats de la section *Usti*

(CMI50 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats, CMI90 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 90% des isolats, CBP : *clinical breakpoints* définis par l'EUCAST pour *A. fumigatus*)

- **Section *Flavi***

Pour la section *Flavi* (n=21), des profils de CMI différents ressortent en fonction des espèces. Ainsi, tous les isolats de l'espèce *A. alliaceus* (n=12) présentent des CMI très élevées à l'amphotéricine B, alors qu'elles restent basses pour les autres espèces (n=9) (Tableau 18). Ceci suggère donc une résistance naturelle de *A. alliaceus* à l'amphotéricine B. *Aspergillus alliaceus* se démarque également des autres espèces cryptiques de la section *Flavi* pour les antifongiques azolés et notamment le voriconazole. En effet, tous les isolats de *A. alliaceus* présentent des CMI basses à cet antifongique, alors que 44,4% des isolats des autres espèces cryptiques de la section présentent une CMI supérieure au CBP (Tableau 18).

		Section <i>Flavi</i> (n=21)	<i>A. alliaceus</i> (n=12)	Autres espèces cryptiques (n=9)	p
Itraconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,06 - 0,5	0,06 - 0,125	0,125 - 0,5	
	CMI50 (mg/l)	0,125	0,125	0,25	
	CMI90 (mg/l)	0,25	0,125	0,5	
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,168	0,118	0,270	0,003
	Nombre > CBP (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Voriconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,25 - 2	0,25 - 0,5	0,5 - 2	
	CMI50 (mg/l)	0,5	0,25	1	
	CMI90 (mg/l)	2	0,5	2	
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,571	0,315	1,260	0,0006
	Nombre > CBP (%)	4 (19%)	0 (0%)	4 (44,4%)	
Posaconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,015 - 0,25	0,015 - 0,25	0,06 - 0,25	
	CMI50 (mg/l)	0,125	0,06	0,125	
	CMI90 (mg/l)	0,25	0,125	0,25	
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,091	0,069	0,134	0,06
	Nombre > CBP (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
Isavuconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,25 - 2	0,25 - 1	0,25 - 2	
	CMI50 (mg/l)	0,5	0,5	1	
	CMI90 (mg/l)	1	1	1	
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,630	0,530	0,794	0,1
	Nombre > CBP (%)	1 (4,8%)	0 (0%)	1 (11,1%)	
Amphotéricine B	Etendue des CMI (mg/l)	0,5 - > 16	4 - > 16	0,5 - 1	
	CMI50 (mg/l)	> 16	> 16	1	
	CMI90 (mg/l)	> 16	> 16	1	
	Moyenne géométrique (mg/l)	4	14,254	0,735	> 10 ⁻⁷
	Nombre > CBP (%)	12 (57,1%)	12 (100%)	0 (0%)	

Tableau 18 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode de référence EUCAST pour les isolats de la section *Flavi*

(CMI50 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats, CMI90 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 90% des isolats, CBP : *clinical breakpoints* définis par l'EUCAST pour *A. fumigatus*)

- **Section *Aspergillus***

Des profils particuliers en fonction des espèces ressortent également pour la section *Aspergillus* (n=28). Ainsi les isolats de l'espèce *A. montevicensis* (n=17) présentent des CMI significativement plus élevées aux antifongiques azolés que les isolats des autres espèces (n=11) (Tableau 19). Pour cette section, les CMI pour l'amphotéricine B restent basses pour tous les isolats.

		Section <i>Aspergillus</i> (n=28)	<i>A. montevideensis</i> (n=17)	Autres espèces cryptiques (n=11)	P
Itraconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,03 - > 8	0,25 - > 8	0,03 - 0,5	
	CMI50 (mg/l)	0,5	0,5	0,25	
	CMI90 (mg/l)	0,7	1	0,5	
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,339	0,665	0,170	0,18
	Nombre > CBP (%)	1 (3,6%)	1 (5,9%)	0 (0%)	
Voriconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,03 - 4	1 - 4	0,03 - 1	
	CMI50 (mg/l)	2	2	0,5	
	CMI90 (mg/l)	2	2	1	
	Moyenne géométrique (mg/l)	1,048	1,920	0,411	> 10 ⁻⁷
	Nombre > CBP (%)	15 (53,6%)	15 (88,2%)	0 (0%)	
Posaconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,015 - 0,5	0,06 - 0,5	0,015 - 0,06	
	CMI50 (mg/l)	0,06	0,125	0,03	
	CMI90 (mg/l)	0,25	0,35	0,06	
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,084	0,152	0,034	0,0003
	Nombre > CBP (%)	2 (7,1%)	2 (11,8%)	0 (0%)	
Isavuconazole	Etendue des CMI (mg/l)	0,03 - 2	1 - 2	0,03 - 1	
	CMI50 (mg/l)	1	2	0,5	
	CMI90 (mg/l)	2	2	1	
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,799	1,503	0,301	> 10 ⁻⁷
	Nombre > CBP (%)	10 (35,7%)	10 (58,8%)	0 (0%)	
Amphotéricine B	Etendue des CMI (mg/l)	0,03 - 0,5	0,03 - 0,125	0,03 - 0,5	
	CMI50 (mg/l)	0,045	0,03	0,125	
	CMI90 (mg/l)	0,25	0,0872	0,25	
	Moyenne géométrique (mg/l)	0,059	0,040	0,108	0,02
	Nombre > CBP (%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	

Tableau 19 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode de référence EUCAST pour les isolats de la section *Aspergillus*

(CMI50 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats, CMI90 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats, CBP : *clinical breakpoints* définis par l'EUCAST pour *A. fumigatus*)

- **Section Nigri**

Pour la section *Nigri* (n=20) de nombreux isolats présentent des CMI élevées aux antifongiques azolés (Tableau 20). Cependant, il n'y a pas de profil particulier de CMI qui ressort pour une espèce donnée, qui peut présenter des CMI élevées ou basses. Ceci suggère donc une acquisition de résistance pour les antifongiques azolés. Concernant l'amphotéricine B, tous les isolats testés de cette section présentent des CMI basses.

	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole	Isavuconazole	Amphotéricine B
Etendue des CMI (mg/l)	0,03 - > 8	0,06 - 2	0,03 - 0,5	0,125 - 16	0,06 - 1
CMI50 (mg/l)	8,5	2	0,25	2	0,5
CMI90 (mg/l)	> 8	2	0,5	4	0,5
Moyenne géométrique (mg/l)	2,817	1,229	0,209	2,000	0,307
Nombre > CBP (%)	10 (50%)	14 (70%)	3 (15%)	16 (80%)	0 (0%)

Tableau 20 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode de référence EUCAST pour les isolats de la section *Nigri*

(CMI50 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats, CMI90 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats, CBP : *clinical breakpoints* définis par l'EUCAST pour *A. fumigatus*)

- **Section Terrei**

Les isolats de la section *Terrei* présentent quasiment tous des CMI élevées pour l'amphotéricine B (Tableau 21). Cependant, certains isolats présentent des CMI basses à cet antifongique, ce qui ne permet pas d'affirmer une résistance naturelle de toute la section. Concernant les antifongiques azolés, des CMI basses semblent être la règle, bien que certains isolats présentent ponctuellement des CMI plus élevées, suggérant ainsi une acquisition de résistance.

	Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole	Isavuconazole	Amphotéricine B
Etendue des CMI (mg/l)	0,125 - 1	0,5 - 4	0,03 - 0,5	0,5 - 4	0,5 - > 16
CMI50 (mg/l)	0,25	1	0,125	1	4
CMI90 (mg/l)	0,65	2,6	0,25	2,6	> 16
Moyenne géométrique (mg/l)	0,281	1,167	0,090	1,212	3,429
Nombre > CBP (%)	0 (0%)	5 (27,8%)	1 (5,6%)	6 (33,3%)	14 (77,8%)

Tableau 21 : Répartition des concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode de référence EUCAST pour les isolats de la section *Terrei*

(CMI50 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats, CMI90 : concentration d'antifongique permettant d'inhiber la croissance de 50% des isolats, CBP : *clinical breakpoints* définis par l'EUCAST pour *A. fumigatus*)

- Autres sections

Enfin, concernant les 5 dernières sections de l'étude, pour lesquelles le nombre d'isolats par section est inférieur à 5 (*Clavati*, *Candidi*, *Cremeri*, *Restricti* et *Flavipedes*), les CMI sont présentées dans le Tableau 22. De manière intéressante, certains isolats présentent des CMI très élevées aux antifongiques azolés, et notamment *A. europaeus* (section *Cremeri*) avec les CMI les plus hautes au voriconazole et à l'isavuconazole de tous les isolats testés, ou *A. iizukae* (section *Flavipedes*) avec des CMI élevées à l'isavuconazole uniquement. Cependant, devant le faible nombre d'isolats, il est difficile de dire s'il s'agit de la règle pour ces espèces ou d'un phénomène ponctuel.

Sections	Espèces	CMI mg/l				
		Itraconazole	Voriconazole	Posaconazole	Isavuconazole	Amphotéricine B
Candidi (n=4)	<i>A. candidus</i>	0,25	1	0,25	1	0,125
	<i>A. subalbicus</i>	0,5	0,25	0,25	0,5	0,06
	<i>A. tritici</i> (n=2)	0,03	0,06	0,03	0,06	0,125
		0,03	0,06	0,03	0,06	0,25
Clavati (n=4)	<i>A. clavatus</i>	> 8	8	> 8	2	0,06
	<i>A. giganteus</i>	0,06	0,25	0,03	0,25	0,03
	<i>A. rhizopodus</i> (n=2)	2	2	0,25	2	0,06
		0,5	2	0,25	2	0,03
Flavipedes (n=3)	<i>A. iizukae</i> (n=3)	0,5	2	0,25	8	0,25
		0,5	1	0,25	8	0,5
		0,5	1	0,25	4	0,125
Restricti (n=3)	<i>A. caesiellus</i> (n=3)	0,06	1	0,015	0,5	0,125
		0,015	0,5	0,015	0,125	0,03
		0,03	0,5	0,015	0,5	0,06
Cremeri (n=2)	<i>A. europaeus</i> (n=2)	0,5	> 16	0,25	> 16	2
		1	> 16	0,5	> 16	2

Tableau 22 : Concentrations minimales inhibitrices (CMI) obtenues par la méthode de référence EUCAST pour les isolats des sections *Candidi*, *Clavati*, *Flavipedes*, *Restricti* et *Cremeri*

Résultats : épidémiologie des espèces cryptiques – Article 3

Les informations sur l'origine des isolats collectés ont pu être obtenues pour la quasi-totalité des isolats grâce à la collaboration des différents utilisateurs. L'analyse de ces données a montré une prédominance d'isolats cliniques (n=368 ; 94,4 %), provenant principalement de prélèvements respiratoires (n=276 ; 75 %), suivis par les prélèvements unguéaux (n=33 ; 9 %) et les prélèvements de conduits auditifs externes (CAE) (n=28 ; 7,6 %). Treize isolats (3,5 %) sont également issus de prélèvements superficiels divers, sept (1,9 %) de prélèvements profonds et enfin, pour 11 isolats (3 %), l'origine du prélèvement n'a pas pu être précisée. Le reste des isolats non cliniques (n=22 ; 5,6 %) est constitué par des isolats environnementaux, issus de prélèvements d'air (n=11) ou de surface (n=2) dans le cadre de la surveillance de l'aérocontamination hospitalière, ou issus d'un centre de contrôle de la qualité de l'eau (n=4).

L'ensemble des 13 sections et des 69 espèces identifiées au cours de l'étude, à l'exception des espèces *A. tsurutae* (section *Fumigati*) et *A. insuetus* (section *Usti*), sont représentées parmi les isolats cliniques (Tableau 23). Tous types de prélèvements cliniques confondus, la principale section retrouvée correspond à la section *Nidulantes* (n=119 ; 32,2 %), tandis que les 3 espèces majoritaires sont *A. welwitschiae* (n=31, section *Nigri*), *A. sublatus* (n=30, section *Nidulantes*) et *A. sydowii* (n=29, section *Nidulantes*).

Section	Nombre d'isolats (% par type de prélèvement)					
	Tous les isolats	Isolats cliniques	Prélèvements respiratoires	Prélèvements unguéaux	CAE	Autres prélèvements
<i>Nidulantes</i>	128 (32,82 %)	119 (32,25 %)	93 (33,7 %)	17 (51,52 %)	1 (3,57 %)	8 (25 %)
<i>Nigri</i>	53 (13,59 %)	53 (14,36 %)	34 (12,32 %)	0 (0 %)	18 (64,29 %)	1 (3,13 %)
<i>Circumdati</i>	52 (13,33 %)	48 (13,01 %)	30 (10,87 %)	11 (33,33 %)	1 (3,57 %)	6 (18,75 %)
<i>Fumigati</i>	51 (13,08 %)	49 (13,28 %)	46 (16,67 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	3 (9,38 %)
<i>Aspergillus</i>	28 (7,18 %)	24 (6,5 %)	18 (6,52 %)	1 (3,03 %)	2 (7,14 %)	3 (9,38 %)
<i>Usti</i>	23 (5,9 %)	21 (5,69 %)	17 (6,16 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	4 (12,5 %)
<i>Flavi</i>	21 (5,38 %)	21 (5,69 %)	15 (5,43 %)	2 (6,06 %)	2 (7,14 %)	2 (6,25 %)
<i>Terrei</i>	18 (4,62 %)	18 (4,88 %)	12 (4,35 %)	0 (0 %)	3 (10,71 %)	3 (9,38 %)
<i>Candidi</i>	4 (1,03 %)	4 (1,08 %)	2 (0,72 %)	2 (6,06 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
<i>Clavati</i>	4 (1,03 %)	4 (1,08 %)	3 (1,09 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (3,13 %)
<i>Restricti</i>	3 (0,77 %)	3 (0,81 %)	2 (0,72 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	1 (3,13 %)
<i>Flavipedes</i>	3 (0,77 %)	3 (0,81 %)	2 (0,72 %)	0 (0 %)	1 (3,57 %)	0 (0 %)
<i>Cremei</i>	2 (0,51 %)	2 (0,54 %)	2 (0,72 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
Total	390	369	276	33	28	32

Tableau 23 : Répartition des isolats cryptiques en fonction des sections et selon l'origine du prélèvement

Les 13 sections de l'étude sont également retrouvées dans les prélèvements d'origine respiratoire, où la section principale reste la section *Nidulantes* (n=93 ; 33,7 %) avec *A. sublatus* comme espèce majoritaire (n=29). La distribution des sections parmi les isolats issus de prélèvements respiratoires est équivalente à celle de l'ensemble des isolats cliniques. Cependant, de manière intéressante, pour la section *Fumigati*, la proportion d'isolats cliniques issus de prélèvements respiratoires est significativement plus importante que pour l'ensemble des autres sections. En effet, 93,9 % des isolats cliniques de la section *Fumigati* sont issus de prélèvements respiratoires, alors que pour l'ensemble des autres sections, ces derniers ne représentent que 71,9 % de l'origine des isolats ($p = 0,002$, test du χ^2) (Figure 21).

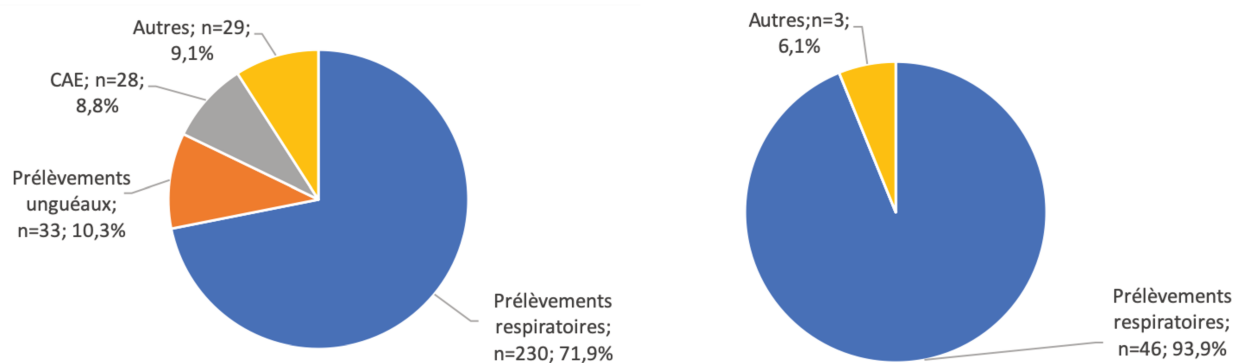


Figure 21 : Distribution en fonction du type de prélèvement, de l'ensemble des isolats cryptiques cliniques (gauche) ou des isolats cliniques de la section *Fumigati* uniquement (droite)

Les sections *Nidulantes* et *Circumdati* représentent à elles deux 84,8% des isolats d'origine unguéale, avec respectivement 17 et 11 isolats chacune, et *A. sydowii* (n=7, section *Nidulantes*) comme principale espèce. Concernant les isolats issus de prélèvements de CAE, la section la plus représentée est la section *Nigri* avec 64,3% des isolats (n=18). La section *Nidulantes* représente quant à elle seulement 3,6% des isolats issus de ce type de prélèvement (n=1).

Nous avons ensuite analysé les pathologies associées aux espèces cryptiques. La plupart des isolats cliniques sont responsables d'une colonisation bronchique (n=225 ; 61,1%), transitoire ou chronique. Les aspergilloses invasives représentent quant à elles 17 isolats (4,6%), chez 17 patients différents. Les autres pathologies retrouvées sont les otomycoses (n=27 ; 7,3%), les onychomycoses (n=26 ; 7,1%) et les aspergilloses chroniques pulmonaires ou sinusiennes

(n=17 ; 4,6%). Enfin, 44 isolats (12%) ont été considérés comme des contaminants, tandis que pour 12 isolats (3,3%) la pathologie associée n'a pas pu être précisée (Figure 22).

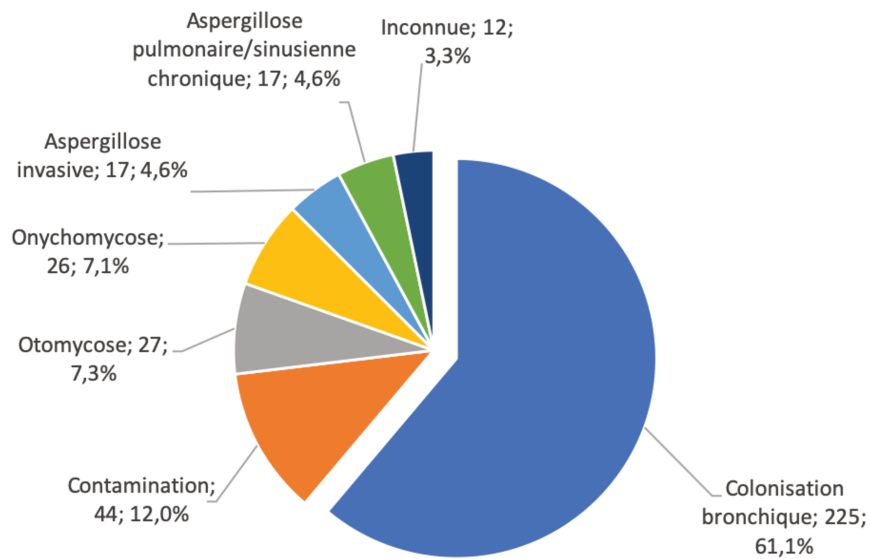


Figure 22 : Distribution des isolats cryptiques en fonction de la pathologie associée

- **Aspergilloses invasives**

Pour le troisième article de la thèse, nous nous sommes concentrés sur les facteurs de risque, les caractéristiques et l'évolution des 17 cas d'aspergilloses invasives. Les formulaires spécifiques de recueil complet ont pu être récupérés pour 15 cas (4 centres). Nous avons également récupéré les données de 51 cas d'AI à *A. fumigatus* survenus sur la même période d'étude dans les mêmes centres afin de comparer leurs caractéristiques.

Article n°3 : *Invasive aspergillosis due to Aspergillus cryptic species: a prospective multicenter study*

En préparation

Les caractéristiques des 15 cas d'infection invasive par une espèce cryptique d'*Aspergillus*, pour lesquels les données complètes ont pu être récupérées sont présentées dans le Tableau 24. Huit espèces cryptiques différentes ont été identifiées, avec *A. sublatus* (5 isolats, section *Nidulantes*) comme espèce la plus fréquente. Les principaux facteurs de risques retrouvés sont la transplantation d'organe solide (n=6, 40%) et une pathologie onco-hématologique (n=5, 33,3%). A noter tout de même, 3 patients présentant comme unique facteur de risque un SDRA en réanimation, dont 2 consécutifs à une infection grippale sévère. De manière intéressante, 5 patients présentaient une préexposition aux antifongiques au moment de la survenue de l'épisode, dont 4 par un antifongique azolé (voriconazole ou posaconazole). La mortalité à 3 mois est élevée à 60%.

En comparaison avec les 51 cas d'AI à *A. fumigatus* survenus sur la même période dans 2 des 4 centres, la préexposition aux antifongiques azolés correspond au seul paramètre significativement différent entre les 2 groupes (Tableau 25). Ceci est à rapprocher de la proportion importante de CMI élevées aux antifongiques parmi les espèces cryptiques et qui pourrait expliquer cette observation. Paradoxalement, cette sensibilité diminuée aux antifongiques ne semble pas être responsable d'une mortalité plus importante chez les patients avec une AI liée à une espèce cryptique, mais pourrait néanmoins entraîner dans les années à venir un changement épidémiologique des espèces impliquées dans les infections invasives.

Patients	Classification	Sexe	Age	Sections	Espèces	Pathologie sous-jacente	Neutropénie (< 500/ μ l)	Traitement immunosuppresseur	Pré-exposition aux antifongiques	Antigène galactomannane LBA	Sérum	Traitement	Devenir à 3 mois
Patient 01	Probable	F	50	<i>Usti</i>	<i>A. calidoustus</i>	Transplantation d'organe solide (poumon)	Non	Glucocorticoïdes + anticalcineurine + mycophénolate	Non	NR	0.52	Voriconazole puis posaconazole + amphotéricine B en aérosol	Vivant
Patient 02	Probable	F	44	<i>Fumigati</i>	<i>A. fischeri</i>	Transplantation d'organe solide (poumon)	Non	Glucocorticoïdes + anticalcineurine + mycophénolate	No	0.11	0.04	Voriconazole puis isavuconazole	Mort
Patient 03	Probable	M	66	<i>Nidulantes</i>	<i>A. sydowii</i>	Induction de leucémie aigüe	Oui	Glucocorticoïdes + méthotrexate	Posaconazole	> 12	2.36	Caspofungine + amphotéricin B puis voriconazole	Vivant
Patient 04	Probable	F	58	<i>Nidulantes</i>	<i>A. sublatius</i>	Maladie auto-immune (syndrome des anti-phospholipides)	Non	Glucocorticoïdes (+ bolus)	Non	0.84	8.78	Voriconazole	Vivant
Patient 05	Probable	M	67	<i>Fumigati</i>	<i>A. udagawae</i>	Induction de leucémie aigüe	Oui	Non	Non	2.92	0.29	Voriconazole	Mort
Patient 06	Probable	M	52	<i>Nidulantes</i>	<i>A. sublatius</i>	Pathologie lymphoproliférative	Oui	Brentuximab	Non	1	0.375	Amphotéricine B puis voriconazole	Mort
Patient 07	Probable	M	28	<i>Nidulantes</i>	<i>A. sublatius</i>	Transplantation d'organe solide (foie)	Non	Anticalcineurine	Non	4.06	3.6	Voriconazole	Mort
Patient 08	Probable	M	64	<i>Usti</i>	<i>A. calidoustus</i>	Transplantation d'organe solide (cœur)	Non	Glucocorticoïdes + anticalcineurine + mycophénolate	Voriconazole	0.08	0.64	Voriconazole	Vivant
Patient 09	Putative	F	58	<i>Nidulantes</i>	<i>A. sublatius</i>	SDRA en réanimation + ECMO (grippe sévère)	Non	Glucocorticoïdes	Non	> 8	> 8	Amphotéricine B	Mort
Patient 10	Prouvée	M	54	<i>Nigri</i>	<i>A. tubingensis</i>	SDRA en réanimation + ECMO (grippe sévère)	Non	Bolus glucocorticoïdes	Non	> 8	6.9	Voriconazole	Mort
Patient 11	Probable	M	74	<i>Nidulantes</i>	<i>A. sublatius</i>	Pathologie onco-hématologique	Oui	Glucocorticoïdes	Non	0.46	0.088	Voriconazole puis amphotéricine B	Mort
Patient 12	Prouvée	M	70	<i>Fumigati</i>	<i>A. lentulus</i>	SDRA en réanimation	Non	Non	Caspofungine	NR	3.2	Amphotéricine B + caspofungine	Mort
Patient 13	Probable	M	67	<i>Nigri</i>	<i>A. tubingensis</i>	Transplantation d'organe solide (poumon)	Non	Glucocorticoïdes (+ bolus) + anticalcineurine	Non	NR	NR	Voriconazole	Vivant
Patient 14	Prouvée	M	58	<i>Usti</i>	<i>A. calidoustus</i>	Transplantation d'organe solide (cœur)	Non	Glucocorticoïdes + anticalcineurine	Voriconazole	NR	0.83	Voriconazole	Mort
Patient 15	Probable	M	65	<i>Flavi</i>	<i>A. alliaceus</i>	Induction de leucémie aigüe	Oui	Chimiothérapie d'induction	Posaconazole	NR	0.56	Voriconazole	Vivant

Tableau 24 : Facteurs de risque, caractéristiques cliniques et devenir des 15 cas d'aspergilloses invasives dues à une espèce cryptique d'*Aspergillus* (LBA : liquide bronchio-alvéolaire, SDRA : syndrome de détresse respiratoire aigüe)

	Espèces cryptiques (n=15)	<i>A. fumigatus</i> (n=51)	P (Test exact de Fischer)
Caractéristiques démographiques			
Age médian	58 (28 - 74)	57 (23 -84)	0.52
Sex ratio (M/F)	13/4	38/13	1
Pathologies sous-jacentes			
Pathologie onco-hématologique	5 (33%)	14 (27.5%)	0.75
Allogreffe de moelle osseuse	0 (0%)	4 (7.8%)	0.57
Transplantation d'organe solide	6 (40%)	20 (39.2%)	1
SDRA en réanimation	3 (20%)	7 (13.7%)	0.68
Autres	1 (6.7%)	6 (11.8%)	1
Immunodépression			
Neutropénie < 500 / μ l	5 (33)	12 (23.5%)	0.5
Traitement immunosuppresseur	13 (86.7%)	39 (76.5%)	0.49
Dont glucocorticoïdes	10 (66.7%)	29 (58.9%)	0.56
Préexposition aux antifongiques	5 (33)	13 (25.5%)	0.53
Dont azolés	4 (26.7%)	2 (3.9%)	0.02
Traitement antifongique ciblé	15 (100%)	49 (96.1%)	1
Dont azolés	13 (86.7%)	43 (84.3%)	1
Multiples traitements	6 (40%)	13 (25.5%)	0.33
Classification			
Prouvée/Probable/Putative	2/11/2	6/40/5	1/0.73/0.65
Biomarqueurs			
Sérum GM \geq 0.5	10/14 (71.4%)	26/48 (54.2%)	0.36
LBA GM \geq 1	6/10 (60%)	26/45 (57.8%)	1
Mortalité à 3 mois	9 (60%)	31 (61%)	1

Tableau 25 : Comparaison des caractéristiques des aspergilloses invasives dues à des espèces cryptiques d'*Aspergillus* à celles liées à *A. fumigatus* (SDRA : syndrome de détresse respiratoire aigüe, GM : galactomannane)

- **Colonisation bronchique**

Concernant la colonisation bronchique, 56 espèces appartenant aux 13 sections ont été retrouvées. Les sections majoritaires sont les sections *Nidulantes* (n=70), *Fumigati* (n=40) et *Nigri* (n=30). Cependant la section *Nigri* est sous représentée : nous avons arrêté les inclusions de l'espèce *A. welwitschiae* assez rapidement, le caractère cryptique de celle-ci étant devenu très discutable après que plusieurs publications l'ont décrit comme majoritaire

au sein de la section *Nigri*. Les principales espèces retrouvées sont donc *A. thermomutatus* (n=18), *A. welwitschiae* (n=17) et *A. sublatus* (n=17).

L'existence préalable d'une pathologie pulmonaire chronique représente la principale condition sous-jacente chez les patients colonisés par une espèce cryptique d'*Aspergillus* (n= 153 ; 68%). Parmi ces pathologies pulmonaires, la mucoviscidose représente la principale affection (n=75) et regroupe 29 espèces cryptiques différentes. De manière intéressante l'espèce *A. thermomutatus* (n=18) est retrouvée exclusivement chez des patients souffrant de mucoviscidose. Il s'agit de la seule espèce avec plusieurs isolats associée à un unique facteur de risque. A côté de la mucoviscidose, les principales pathologies pulmonaires retrouvées dans la colonisation bronchique sont la BPCO (n=28), une néoplasie pulmonaire (n=18), l'asthme sévère (n=13) ou une tuberculose ancienne ou en cours de traitement (n=4). D'autres pathologies pulmonaires moins représentées ont également été retrouvées (n=17), comme la sarcoïdose ou la fibrose pulmonaire idiopathique. La colonisation bronchique par des espèces cryptiques a également été observée chez des patients immunodéprimés (n=39), dont des transplantés d'organe solide (n=26), des patients avec une hémopathie (n=9) ou avec un autre déficit immunitaire (n=4). Enfin, la colonisation a été retrouvée chez des patients sans pathologie sous-jacente particulière (n=28) (Figure 23).

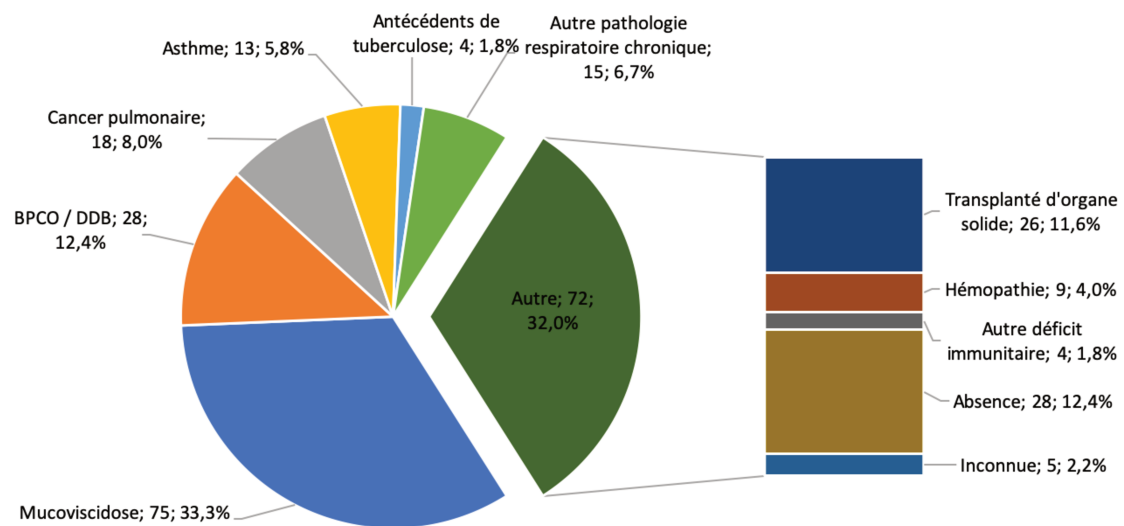


Figure 23 : Facteurs de risque des patients colonisés au niveau bronchique par une espèce cryptique

- **Otomycoses**

Concernant les otomycoses (n=27), 7 sections sont représentées dont la section *Nigri* (n=18 ; 4 espèces) qui concentre 66,7% des cas (Tableau 26). L'espèce la plus fréquemment retrouvée est *A. welwitschiae* (n=13). Ces résultats sont en accord avec la littérature où la section *Nigri* est la section largement majoritaire dans les otomycoses.

	<i>Nigri</i> (n=18)	<i>Terrei</i> (n=3)	<i>Flavi</i> (n=2)	Autres sections (n=4)
Espèces cryptiques	<i>A. welwitschiae</i> (n=13)	<i>A. citrinoterreus</i> (n=2)	<i>A. alliaceus</i> (n=2)	<i>A. montevidensis</i> (n=1) (<i>Aspergillus</i>)
	<i>A. tubingensis</i> (n=3)	<i>A. aureoterreus</i> (n=1)		<i>A. subramanianii</i> (n=1) (<i>Circumdati</i>)
	<i>A. luchuensis</i> (n=1)			<i>A. quadrilineatus</i> (n=1) (<i>Nidulantes</i>)
	<i>A. piperis</i> (n=1)			<i>A. iizukae</i> (n=1) (<i>Flavipedes</i>)

Tableau 26 : Distribution des isolats cryptiques retrouvés dans les otomycoses en fonction des sections et des différentes espèces

Les autres sections ont également déjà été rapportées dans la littérature comme cause d'otomycoses. Cependant il s'agit ici des premiers cas où les espèces *A. luchuensis*, *A. piperis*, *A. citrinoterreus*, *A. aureoterreus* et *A. subramanianii* sont retrouvées.

- **Onychomycoses**

Concernant les onychomycoses (n=26), seules 4 sections sont représentées, dont les sections *Nidulantes* (n=12 ; 6 espèces) et *Circumdati* (n=10 ; 5 espèces) qui concentrent à elles deux 84,6% des cas. L'espèce la plus fréquemment retrouvée est *A. sydowii* (n=5, section *Nidulantes*), suivie par l'espèce *A. insulicola* (n=4, section *Circumdati*). De manière intéressante, les 6 espèces de la section *Nidulantes* impliquées, font toutes partie des séries *Versicolores* et *Unguium*, mais pas de la série *Nidulantes*. Les deux autres sections retrouvées sont les sections *Candidi* (n=2 ; 2 espèces) et *Flavi* (n=2 ; 1 espèce) (Tableau 27).

	<i>Nidulantes</i> (n=12)	<i>Circumdati</i> (n=10)	<i>Candidi</i> (n=2)	<i>Flavi</i> (n=2)
Espèces cryptiques	<i>A. sydowii</i> (n=5)	<i>A. insulicola</i> (n=4)	<i>A. tritici</i> (n=1)	<i>A. alliaceus</i> (n=2)
	<i>A. unguis</i> (n=2)	<i>A. sclerotiorum</i> (n=2)	<i>A. subalbidus</i> (n=1)	
	<i>A. puulaauensis</i> (n=2)	<i>A. westerdijkiae</i> (n=2)		
	<i>A. hongkongensis</i> (n=1)	<i>A. ochraceopetaliformis</i> (n=1)		
	<i>A. amoenus</i> (n=1)	<i>A. persii</i> (n=1)		
	<i>A. tabacinus</i> (n=1)			

Tableau 27 : Distribution des isolats cryptiques retrouvés dans les onychomycoses en fonction des sections et des différentes espèces

Ces 4 sections ont déjà été rapportées dans la littérature comme causes d'onychomycose. Cependant, il s'agit ici des premiers cas où les espèces *A. tabacinus*, *A. puulaauensis*, *A. ochraceopetaliformis* et *A. subalbidus* sont retrouvées.

Discussion

Au cours de ce travail, nous avons pu étudier la plus grande série d'espèces cryptiques d'*Aspergillus* combinant une identification moléculaire précise, l'étude des profils de sensibilité aux antifongiques par une méthode de référence et l'implication clinique des isolats. L'application MSI et son réseau d'utilisateurs se sont avérés être un outil indispensable à la réalisation de cette étude. En effet, nous avons montré que la version 1 de l'application était capable de bien distinguer les espèces cryptiques par rapport à l'espèce *sensu stricto* au sein d'une section, ce qui n'est pas possible avec les méthodes basées sur la morphologie. L'application MSI nous a donc permis d'effectuer un dépistage efficace des espèces cryptiques parmi l'ensemble des 15 305 *Aspergillus* identifiés sur la base pendant la période d'étude, sans avoir recours à une identification moléculaire, qui n'aurait pas été réalisable à cette échelle. La plupart des espèces cryptiques d'*Aspergillus* restent rares et minoritaires par rapport aux espèces princeps. La collaboration multicentrique avec 14 des principaux utilisateurs de l'application situés dans 3 pays différents et regroupant des laboratoires de centres hospitaliers universitaires ou des laboratoires privés, nous a permis d'obtenir ce nombre très important de 390 isolats appartenant à 69 espèces parmi 13 sections. Bien que nous n'ayons pas pu récupérer l'ensemble des isolats cryptiques, l'échantillonnage que nous avons réalisé s'est avéré représentatif de l'ensemble des isolats identifiés sur l'application. L'application MSI est donc un outil précieux pour la réalisation d'études sur les espèces cryptiques.

Cependant, au cours de ce travail nous avons été confrontés à des difficultés pour suivre l'évolution constante et très labile de la taxonomie du genre *Aspergillus*. En effet, un recensement exhaustif effectué par l'*International Commission of Penicillium and Aspergillus* au début de la thèse (janvier 2018), faisait état de 379 espèces différentes et 26 sections. En juin 2020, Houbraken et *al.* ont publié une mise à jour de la classification des *Aspergillus* comprenant 436 espèces différentes, réparties en 81 séries et appartenant à 27 sections (2). En comparaison de ces chiffres, on notera que seules 184 espèces étaient répertoriées en 2000 (19). Au-delà de l'augmentation considérable du nombre d'espèces, ce sont les changements de noms ou les suppressions d'espèces ou de sections qui ont posé le plus de difficultés. Par exemple, l'espèce *A. sublatus* (section *Nidulantes*) appelée initialement *Emericella sublata*, a

été nommée *A. sublatus* en 2014 (20), avant de changer de nom pour *A. latus* en 2016 (128), pour être de nouveau nommée *A. sublatus* en 2020 (2). Un autre exemple concerne l'espèce *A. felis* (section *Fumigati*), décrite initialement en 2013 (129), qui a ensuite été scindée en 3 espèces distinctes *A. felis*, *A. pseudofelis* et *A. parafelis* (130), pour être finalement réunies de nouveau en la seule espèce *A. felis* en 2018 (131). Nous avons également été confronté à certaines difficultés concernant l'identification moléculaire précise. En effet, bien que la combinaison des deux marqueurs utilisés (les gènes *cmd* et *benA*) ait permis une discrimination précise de la plupart des espèces, elle s'est avérée insuffisante pour certains groupes d'espèces comme *A. tabacinus* (section *Nidulantes*, série *Versicolores*) ou *A. insulicola* (section *Circumdati*, série *Steyniorum*). De plus, la définition moléculaire d'une espèce n'est pas totalement claire. Sur la base des résultats obtenus avec les arbres phylogénétiques, nous avons probablement mis au jour des espèces non encore décrites. C'est notamment le cas pour certains isolats de l'espèce *A. thermomutatus* (section *Fumigati*) qui sont séparés en deux groupes phylogénétiquement distincts avec un score de *bootstrap* supérieur à 99% (Annexe 10). C'est également le cas pour les espèces *A. alabamensis* (section *Terrei*) et *A. subalbidus* (section *Candidi*), où des isolats sont phylogénétiquement séparés de la souche de référence, tout en étant identiques à des séquences publiées mais sans identification précise d'espèce (132).

Ces difficultés rencontrées en termes de taxonomie et d'identification moléculaire ont été objectivées par les erreurs d'identification entre certaines espèces cryptiques d'une même section, observées sur la première version de l'application. En effet, les deux causes principales d'erreurs mises en évidence étaient liées soit à l'évolution de la taxonomie (suppression, ajout ou changement de nom d'une espèce) soit à une mauvaise identification moléculaire de la souche de référence. Par exemple, la séquence de référence du gène *cmd* de l'espèce *A. sublatus*, qui correspond au seul marqueur moléculaire permettant la distinction avec l'espèce *A. quadrilineatus*, n'était pas encore disponible au moment de la construction de la base (133). Certaines références d'*A. sublatus* ont donc été identifiées à tort en *A. quadrilineatus* par le séquençage du gène *benA*, entraînant des erreurs d'identification entre ces 2 espèces sur la version 1 de l'application. Les principales erreurs observées ont été corrigées dans la version 2 de l'application qui continue à être mise à jour régulièrement et qui contient actuellement 162 espèces différentes. Bien que de nombreuses espèces d'*Aspergillus* ne soient pas encore présentes, la version 2 de l'application MSI est de loin la plus complète et la plus performante des bases de données de spectres de masse disponibles

(Tableau 13). Une étude récente portant sur l'évaluation d'une base de données indépendante utilisant le système Vitek MS, a également montré des performances inférieures à la version 2 de l'application MSI pour l'identification des espèces cryptiques, même si ce ne sont pas les mêmes isolats qui ont été testés (134). Une surveillance étroite des changements de taxonomie et une identification précise des références sont donc des éléments clés pour l'optimisation des performances d'identification de la base de données de spectres de masse.

L'étude de la sensibilité aux antifongiques par la méthode de référence en milieu liquide EUCAST a montré une tendance des espèces cryptiques à avoir des CMI plus élevées aux antifongiques azolés et à l'amphotéricine B, par rapport aux espèces *sensu stricto*. En effet, en prenant comme seuils les CBP d'*A. fumigatus*, entre 40 et 50% des isolats présentent des CMI supérieures à ces seuils. Un des principaux intérêts de cette étude multicentrique est d'avoir pu étudier un nombre important d'isolats pour certaines sections et espèces rares. Ainsi, nous disposons de 10 isolats ou plus pour 13 espèces différentes. Ceci nous a permis de mettre en évidence des profils de résistance propres à une section entière, comme pour la section *Usti* où l'ensemble des isolats présentent des CMI très élevées aux antifongiques azolés, suggérant une résistance naturelle pour cette section. De manière intéressante, nous avons également observé des profils de résistance spécifiques à une ou plusieurs espèces, par rapport aux autres espèces de la section. C'est notamment le cas des sections *Fumigati*, *Circumdati*, *Flavi* et *Aspergillus*. Parmi les espèces notables avec un nombre important d'isolats, certaines présentent des CMI élevées aux antifongiques azolés (*A. montevidensis* [section *Aspergillus*] pour le voriconazole et l'isavuconazole et *A. thermomutatus* [section *Fumigati*] pour l'ensemble de la classe), à l'amphotéricine B (*A. westerdijkiae* [section *Circumdati*] et *A. alliaceus* [section *Flavi*]), ou à l'ensemble des antifongiques testés (*A. lentulus* [section *Fumigati*] et *A. sclerotiorum* [section *Circumdati*]). Ces résultats viennent ainsi confirmer sur un nombre important d'isolats, les observations plus ou moins éparses précédemment rapportées dans la littérature (83, 101, 102, 104, 107). De plus, les faibles variations de CMI observées au sein de ces espèces suggèrent une résistance naturelle correspondant au phénotype sauvage. Ces profils de sensibilité « espèce-dépendants » soulignent l'importance de l'identification précise des *Aspergillus*. A l'inverse, certaines espèces présentent une grande hétérogénéité de CMI comme *A. sydowii*, *A. creber* et *A. jensenii* de la série *Versicolores* (section *Nidulantes*). Ceci suggère plutôt une sensibilité naturelle pour ces espèces avec l'acquisition d'une résistance pour certains isolats.

Cependant, nos données sur la sensibilité des espèces cryptiques restent incomplètes. En effet, pour un certain nombre d'espèces nous n'avons testé que quelques isolats. Bien que certaines de ces espèces présentent des CMI élevées à un ou plusieurs antifongiques, il est difficile d'apporter une conclusion sur le profil de sensibilité naturelle. Pour ces espèces rares, dont peu de résultats sont disponibles également dans la littérature, il est donc important de continuer à récolter des isolats et de les tester. Un des moyens d'optimiser la collecte de ces isolats serait de déclencher une alerte automatique sur l'application MSI à chaque fois qu'un des utilisateurs identifie une de ces espèces.

Devant la diversité des profils observés de sensibilité et le manque de données pour certaines espèces, il semble indispensable en routine de déterminer les CMI lors de l'identification d'un isolat d'*Aspergillus* pathogène en plus d'une identification précise de l'espèce. La technique EUCAST en milieu liquide que nous avons utilisée, correspond à une des méthodes de référence pour la détermination des CMI des champignons. Cependant, c'est une méthode longue et fastidieuse à mettre en œuvre, qui nécessite des compétences particulières et qui n'est donc pas adaptée à un laboratoire de routine. Nous avons donc décidé de comparer les résultats obtenus par la technique EUCAST avec ceux obtenus avec les bandelettes à gradient de concentration, qui sont très utilisées et faciles à mettre en œuvre. De telles comparaisons ont déjà montré de bons résultats pour les espèces *sensu stricto* (135, 136), cependant il n'y avait pas encore de données disponibles pour les espèces cryptiques. Les résultats obtenus sur un panel de 30 isolats cryptiques de la section *Fumigati*, ont montré des discordances importantes entre les 2 méthodes en fonction du temps d'incubation. Nous avons montré qu'il est important pour ces espèces à croissance lente, de prolonger la durée d'incubation jusqu'à 72h, pour la lecture des CMI des antifongiques azolés avec les bandelettes à gradient de concentration, afin de détecter les isolats résistants. De tels résultats ont déjà été mis en évidence pour ces espèces avec la technique Sensititre YeastOne (105). Pour l'amphotéricine B, cela ne semble pas nécessaire. Il sera intéressant de réaliser les mêmes comparaisons sur les isolats cryptiques des autres sections afin de déterminer s'il est aussi nécessaire de prolonger la durée d'incubation.

Une des alternatives aux bandelettes à gradient de concentration, pour détecter des isolats résistants en routine, est l'utilisation de géloses contenant une concentration fixe d'antifongique. Cette méthode a déjà fait ses preuves pour la détection des isolats d'*Aspergillus fumigatus sensu stricto* résistants aux antifongiques azolés (96). Des premiers résultats obtenus pour l'itraconazole et le voriconazole, sur un panel de 30 isolats cryptiques

de la section *Fumigati* et 17 de la section *Circumdati*, ont montré une bonne concordance avec la méthode EUCAST pour la détection des isolats résistants. Bien que ces résultats doivent être confirmés sur un plus grand nombre d'isolats, cette méthode pourrait devenir très intéressante en routine.

Au cours de cette étude, nous nous sommes concentrés sur la mesure des CMI pour les antifongiques azolés disponibles en médecine humaine et sur l'amphotéricine B. Concernant les échinocandines, elles présentent uniquement une activité fongistatique sur les *Aspergillus*, et ne sont donc pas les molécules de première intention pour le traitement des aspergilloses humaines. De plus, pour ces antifongiques, la détermination des concentrations minimales effectives (CME) par la méthode de référence EUCAST en milieu liquide peut s'avérer délicate et peut amener à des résultats erronés. En effet, la CME correspond à la concentration du premier puits où un changement de morphologie des filaments mycéliens est observé, après une lecture subjective au microscope inversé. Nous avons donc fait le choix de ne pas tester ces antifongiques. Une nouvelle méthode pour l'étude de la sensibilité aux échinocandines a été récemment développée par l'EUCAST et semble plus facile à mettre en œuvre (137). Il pourra donc être intéressant de tester nos isolats avec ce nouveau protocole. Il sera également intéressant de tester la sensibilité à d'autres antifongiques comme l'olorofim, qui fait partie de la nouvelle classe des orotomides et qui a montré des résultats intéressants sur des isolats d'*Aspergillus* sensibles ou résistants aux antifongiques azolés (92).

Bien que nous ayons identifié un nombre important d'isolats présentant une résistance à un ou plusieurs antifongiques, nous n'avons pas pu mettre en évidence les mécanismes impliqués. En effet, nous avons séquencé le gène *cyp51a* de plusieurs isolats de la section *Fumigati*, sensibles ou résistants aux antifongiques azolés. En comparant les séquences protéiques obtenues à celles d'isolats d'*A. fumigatus sensu stricto*, nous avons mis évidence un certain degré de polymorphisme entre les espèces. Cependant aucune mutation n'a pu être associée à un profil de résistance particulier. De plus, au niveau des positions reconnues comme étant responsables d'une résistance en cas de mutations (Tableau 8), nous avons trouvé des séquences identiques aux souches sauvages et sensibles d'*A. fumigatus sensu stricto*. Ces résultats suggèrent donc l'existence d'un autre mécanisme de résistance et sont concordants avec ceux de la littérature. En effet, deux études récentes, portant également sur l'étude d'espèces cryptiques de la section *Fumigati* résistantes aux antifongiques azolés, n'ont pas réussi à démontrer le rôle des mutations de la protéine Cyp51A à l'aide de modèles

d'homologie structurale de la protéine *in silico* (106, 124). Parmi, les autres mécanismes possiblement impliqués dans la résistance aux azolés, l'étude des pompes d'efflux et de la protéine HMG-CoA réductase semble particulièrement intéressante. Parent et *al.* ont ainsi montré que la résistance aux azolés d'*A. turcosus* (section *Fumigati*) pourrait être liée à un mécanisme d'efflux (124).

Certains isolats appartenant à d'autres sections semblent également très intéressants pour étudier les mécanismes de résistance aux antifongiques des *Aspergillus*. En effet, nous avons récupéré des isolats présentant des hauts niveaux de résistance *in vitro*, notamment *A. europaeus* (section *Cremeri*) pour le voriconazole et l'isavuconazole ou *A. westerdijkiae*, *A. insulicola*, *A. ochraceopetaliformis* (section *Circumdati*) et *A. alliaceus* (section *Flavi*) pour l'amphotéricine B. Ces isolats pourraient donc servir de bons modèles d'étude de la résistance à ces antifongiques. De plus, pour certaines espèces comme *A. sydowii*, nous avons récupéré des isolats sensibles et résistants, aux azolés et/ou à l'amphotéricine B. La comparaison des profils moléculaires et protéiques entre ces isolats pourra ainsi potentiellement expliquer le mécanisme impliqué dans l'acquisition de la résistance.

Le développement du séquençage des génomes complets des différentes espèces d'*Aspergillus* devient un outil intéressant pour appréhender les mécanismes de résistance dans leur globalité. A ce jour, plus de 400 génomes complets, correspondant à 98 espèces différentes sont disponibles. La technologie *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR)-Cas9, pourrait également être un outil puissant pour l'étude d'isolats résistants aux antifongiques, comme cela a déjà été fait sur des levures (138), ou sur des souches d'*A. fumigatus sensu stricto* (139). Enfin, au-delà des études de sensibilité *in vitro* effectuées, il pourrait également être intéressant d'effectuer des études *in vivo*, notamment en utilisant le modèle de *Galleria mellonella* qui a déjà fait ses preuves pour l'étude de la résistance des *Aspergillus* (140).

Cette étude a montré l'importance et la diversité des espèces cryptiques d'*Aspergillus* dans des prélèvements humains. En effet, parmi les 390 isolats étudiés, 368 correspondent à des isolats cliniques qui se répartissent en 67 espèces différentes (13 sections), dont 8 retrouvées dans des infections invasives. De plus, une enquête sur les centres déclarant identifier tous leurs isolats d'*Aspergillus* sur l'application MSI, a montré une proportion de l'ordre de 30% d'espèces cryptiques parmi les isolats cliniques d'*Aspergillus*. Cette proportion est bien plus importante que celle décrite dans la littérature, où elle est comprise entre 10 et 15% selon les études (86, 88). Cette différence peut s'expliquer notamment par les performances

d'identification de l'application qui permet d'améliorer la détection d'une espèce cryptique, même pour des isolats considérés comme peu pathogènes où l'identification moléculaire précise est peu réalisée. De plus, l'application MSI permet également d'identifier des *Aspergillus* peu sporulant et présentant uniquement des filaments mycéliens stériles en microscopie, qui n'auraient donc même pas été identifiés comme des *Aspergillus* par les techniques conventionnelles.

Cependant, cette valeur de 30% prend en compte des espèces cryptiques relativement fréquentes comme *A. welwitschiae*, *A. tubingensis* (section *Nigri*), *A. calidoustus* (section *Usti*) ou *A. sydowii* (section *Nidulantes*, série *Versicolores*). Or, il a été montré précédemment (108, 109, 141), et les données d'utilisation de l'application MSI le confirment, que ces espèces sont bien plus fréquentes que l'espèce *sensu stricto* de la section à laquelle elles appartiennent (en considérant *A. versicolor* comme référence pour *A. sydowii*). En conséquence, la notion d'espèce cryptique pour ces espèces sera probablement être remise en cause très prochainement.

La diversité des espèces cryptiques dans les prélèvements d'origine humaine est notamment importante dans la colonisation bronchique, principalement chez les patients présentant une pathologie respiratoire chronique. Pour la plupart des espèces cette observation peut être uniquement le reflet de l'exposition environnementale des patients, qui ne parviennent pas à expirer totalement les spores d'*Aspergillus* inhalées du fait de leur pathologie. Néanmoins, de manière intéressante, l'espèce *A. thermomutatus* a été retrouvée en colonisation bronchique uniquement chez des patients souffrant de mucoviscidose, dans divers centres (Toulouse, Aarhus, Paris, Montpellier). Ceci suggère l'existence pour cette espèce, d'un pouvoir pathogène particulier ou d'une adaptation aux conditions spécifiques retrouvées dans les bronches des patients souffrant de mucoviscidose. Cette observation nécessite des investigations complémentaires. Le séquençage récent du génome complet d'*A. thermomutatus* devrait pouvoir amener également des éléments de réponse supplémentaires (142).

Certaines sections et/ou espèces semblent également présenter un pouvoir pathogène ou un tropisme particulier. En effet, les onychomycoses sont principalement liées aux sections *Nidulantes* et *Circumdati* alors que les otomycoses sont principalement liées aux espèces de la section *Nigri*. De plus, les espèces de la section *Fumigati* sont quasiment retrouvées uniquement dans les prélèvements respiratoires. L'étude des facteurs de virulence pouvant expliquer ces observations est donc importante pour mieux appréhender ces pathologies et

devrait être facilitée, tout comme l'étude des mécanismes de résistance aux antifongiques, par la disponibilité de plus en plus importante des génomes complets des différentes espèces.

Enfin, l'étude des 15 cas d'aspergilloses invasives dues à des espèces cryptiques, n'a pas mis en évidence de différences majeures par rapport aux AI liés à *A. fumigatus*. En effet, les facteurs de risque, les pathologies sous-jacentes, les présentations cliniques et le devenir des AI cryptiques ne sont significativement pas différents de ceux des AI à *A. fumigatus*. De manière intéressante, pour les 2 groupes, la transplantation d'organe solide représente désormais le principal facteur de risque d'AI. Le seul facteur significativement associé aux AI cryptiques correspond à la préexposition à un traitement antifongique azolé. Cette observation est à confronter à la proportion élevée de résistance observée parmi les espèces cryptiques. Or, les patients à haut risque d'AI reçoivent désormais fréquemment une prophylaxie par un antifongique azolé, notamment par posaconazole. Ceci pourrait dans les années à venir, entraîner un changement épidémiologique des espèces impliquées dans les aspergilloses invasives, avec une émergence d'espèces cryptiques résistantes, comme cela a déjà été évoqué pour d'autres champignons (143). De bonnes connaissances de l'épidémiologie et des résistances aux antifongiques des espèces cryptiques, ainsi que la mise à disposition d'un système permettant leur identification précise et aisée, sont désormais essentielles. Ceci souligne tout l'intérêt des résultats obtenus au cours de ce travail et renforce la nécessité de poursuivre l'amélioration des connaissances sur les espèces cryptiques d'*Aspergillus*, à travers la mise en œuvre de travaux collaboratifs multicentriques, afin d'optimiser la prise en charge des patients.

Conclusion

Ce travail au cours duquel nous avons constitué une importante collection d'isolats d'espèces cryptiques et rares d'*Aspergillus*, nous a permis d'améliorer et d'apporter de nouvelles connaissances sur ces espèces. D'un côté, nous avons mis en évidence des profils de sensibilité naturelle aux antifongiques propres à certaines sections ou espèces. D'un autre côté, nous avons montré toute la diversité des espèces impliquées en pathologie humaine, dont certaines n'avaient pas encore été décrites, ainsi que le tropisme pathogène particulier de quelques espèces. Ceci souligne donc toute l'importance de l'identification précise des espèces cryptiques d'*Aspergillus*.

Au cours de ce travail, nous avons également démontré et amélioré les performances de l'application MSI pour l'identification des espèces cryptiques d'*Aspergillus* à partir de leurs spectres de masse. Cela, ajouté à l'important réseau international d'utilisateurs, en fait désormais un outil puissant pour la détection d'espèces rares et peu étudiées ou pour la conduite d'études épidémiologiques plus globales.

Enfin, l'importante collection d'isolats constituée ouvre tout un champ de perspectives qui n'ont pu être développées au cours de ce travail, comme l'étude des mécanismes de résistance aux antifongiques ou la compréhension des mécanismes physiopathologiques expliquant la pathogénicité de certaines espèces.

Bibliographie

1. Micheli PA. 1729. Nova plantarum genera
2. Houbraken J, Kocsubé S, Visagie CM, Yilmaz N, Wang X-C, Meijer M, Kraak B, Hubka V, Bensch K, Samson RA, Frisvad JC. 2020. Classification of *Aspergillus*, *Penicillium*, *Talaromyces* and related genera (Eurotiales): An overview of families, genera, subgenera, sections, series and species. *Studies in Mycology* 95:5–169.
3. 2006. Etymologia : *Aspergillus*. *Emerg Infect Dis* 12:415–415.
4. Ojeda-López M, Chen W, Eagle CE, Gutiérrez G, Jia WL, Swilaiman SS, Huang Z, Park H-S, Yu J-H, Cánovas D, Dyer PS. 2018. Evolution of asexual and sexual reproduction in the aspergilli. *Studies in Mycology* 91:37–59.
5. VandenBergh MFQ, Verweij PE, Voss A. 1999. Epidemiology of nosocomial fungal infections: invasive aspergillosis and the environment. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 34:221–227.
6. Latgé J-P, Chamilos G. 2019. *Aspergillus fumigatus* and Aspergillosis in 2019. *Clin Microbiol Reviews* 33:e00140-18, /cmr/33/1/CMR.00140-18.atom.
7. Dyer PS, O’Gorman CM. 2012. Sexual development and cryptic sexuality in fungi: insights from *Aspergillus* species. *FEMS Microbiol Rev* 36:165–192.
8. Bennet JW. 2010. An overview of the genus *Aspergillus*, p. 1–19. *In* *Aspergillus molecular biology and genomics* M. Machida and K. Gomi. Caister Academic Press.
9. Gibbons JG, Rokas A. 2013. The function and evolution of the *Aspergillus* genome. *Trends in Microbiology* 21:14–22.
10. Boruta T, Bizukojc M. 2017. Production of lovastatin and itaconic acid by *Aspergillus terreus*: a comparative perspective. *World J Microbiol Biotechnol* 33:34.
11. Seyedmousavi S, Guillot J, Arné P, de Hoog GS, Mouton JW, Melchers WJG, Verweij PE. 2015. *Aspergillus* and aspergilloses in wild and domestic animals: a global health concern with parallels to human disease. *Med Myco* 53:765–797.
12. Linné C von. 1753. *Species plantarum*. Impensis Laurentii Salvii, Holmiae.
13. Mayr E. 1942. *Systematics and the origin of species*. Columbia University Press, New York.
14. Hey J, Fitch WM, Ayala FJ. 2005. Systematics and the origin of species: An introduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:6515–6519.
15. Samson RA, Varga J. 2009. What is a species in *Aspergillus*? *Med Mycol* 47:S13–

S20.

16. Norvell LL. 2011. Fungal nomenclature. 1. Melbourne approves a new Code. *Mycotaxon* 116:481–490.
17. Link HF. 1809. Observationes in ordines plantarum naturales. *Magazin der Gesellschaft Naturforschenden Freunde Berlin* 3:3–42.
18. Fresenius G. 1863. *Aspergillus fumigatus* Fresen, p. 81–82. *In* *Beitrage zur mykologie*.
19. Pitt JI. 2000. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae, p. 9–49. *In* *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*, R.A. Samson and J.I. Pitt. Harwood Academic Publishers, London.
20. Samson RA, Visagie CM, Houbraken J, Hong S-B, Hubka V, Klaassen CHW, Perrone G, Seifert KA, Susca A, Tanney JB, Varga J, Kocsubé S, Szigeti G, Yaguchi T, Frisvad JC. 2014. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Studies in Mycology* 78:141–173.
21. Kocsubé S, Perrone G, Magistà D, Houbraken J, Varga J, Szigeti G, Hubka V, Hong S-B, Frisvad JC, Samson RA. 2016. *Aspergillus* is monophyletic: Evidence from multiple gene phylogenies and extrolites profiles. *Studies in Mycology* 85:199–213.
22. Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. 2006. Molecular Studies Reveal Frequent Misidentification of *Aspergillus fumigatus* by Morphotyping. *Eukaryotic Cell* 5:1705–1712.
23. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. 2012. Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice: *Aspergillus* species complex in the clinical setting. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1273:18–24.
24. de Hoog GS. 2019. *Atlas of clinical fungi*, Third edition. Utrecht.
25. Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P, Rolain JM, Raoult D. 2009. Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Clin infect dis* 49:543–551.
26. Gautier M, Ranque S, Normand A-C, Becker P, Packeu A, Cassagne C, L'Ollivier C, Hendrickx M, Piarroux R. 2014. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clinical Microbiology and Infection* 20:1366–1371.
27. Normand A-C, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, Piarroux R. 2017. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiol* 17:25.

28. Lavigne J-P, Espinal P, Dunyach-Remy C, Messad N, Pantel A, Sotto A. 2013. Mass spectrometry: a revolution in clinical microbiology? *Clinical Chemistry and Laboratory Medicine* 51.
29. Lass-Flörl C, Roilides E, Löffler J, Wilflingseder D, Romani L. 2013. Minireview: host defence in invasive aspergillosis: Host defence in invasive aspergillosis. *Mycoses* 56:403–413.
30. Park SJ, Mehrad B. 2009. Innate Immunity to *Aspergillus* Species. *CMR* 22:535–551.
31. Botterel F, Gross K, Ibrahim-Granet O, Khoufache K, Escabasse V, Coste A, Cordonnier C, Escudier E, Bretagne S. 2008. Phagocytosis of *Aspergillus fumigatus* conidia by primary nasal epithelial cells in vitro. *BMC Microbiol* 8:97.
32. Espinosa V, Rivera A. 2016. First Line of Defense: Innate Cell-Mediated Control of Pulmonary Aspergillosis. *Front Microbiol* 7.
33. Margalit A, Kavanagh K. 2015. The innate immune response to *Aspergillus fumigatus* at the alveolar surface. *FEMS Microbiology Reviews* 39:670–687.
34. Plaignaud M. Observation sur un fungus du sinus maxillaire. *Journal de médecine, chirurgie, pharmacie* 87:244–251.
35. Bongomin F, Gago S, Oladele R, Denning D. 2017. Global and Multi-National Prevalence of Fungal Diseases—Estimate Precision. *JoF* 3:57.
36. Richardson M, Bowyer P, Sabino R. 2019. The human lung and *Aspergillus*: You are what you breathe in? *Medical Mycology* 57:S145–S154.
37. Gago S, Denning DW, Bowyer P. 2019. Pathophysiological aspects of *Aspergillus* colonization in disease. *Medical Mycology* 57:S219–S227.
38. Warris A, Bercusson A, Armstrong-James D. 2019. *Aspergillus* colonization and antifungal immunity in cystic fibrosis patients. *Medical Mycology* 57:S118–S126.
39. Kosmidis C, Denning DW. 2015. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax* 70:270–277.
40. Stevens DA, Moss RB, Kurup VP, Knutsen AP, Greenberger P, Judson MA, Denning DW, Cramer R, Brody AS, Light M, Skov M, Maish W, Mastella G, participants in the Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. 2003. Allergic Bronchopulmonary Aspergillosis in Cystic Fibrosis—State of the Art: Cystic Fibrosis Foundation Consensus Conference. *Clin infect dis* 37:S225–S264.
41. Alarid-Coronel J, Celis-Aguilar E, Escobar-Aispuro L, Muñoz-Estrada V. 2018. Otomycosis in immunocompetent patients: Clinical and mycological features. Our experience with 40 cases. *Clin Otolaryngol* 43:373–377.

42. Sabz G, Gharaghani M, Mirhendi H, Ahmadi B, Gatee MA, Sisakht MT, Hemati A, Mohammadi R, Taghavi J, Nouripour-Sisakht S. 2019. Clinical and microbial epidemiology of otomycosis in the city of Yasuj, southwest Iran, revealing *Aspergillus tubingensis* as the dominant causative agent. *Journal of Medical Microbiology* 68:585–590.
43. Bongomin F, Batac CR, Richardson MD, Denning DW. 2018. A Review of Onychomycosis Due to *Aspergillus* Species. *Mycopathologia* 183:485–493.
44. Noguchi H, Matsumoto T, Kimura U, Hiruma M, Kano R, Yaguchi T, Ihn H. 2020. Non-dermatophyte Mould Onychomycosis in Japan. *Medical Mycology Journal* 61:23–31.
45. Manikandan P. 2008. *Aspergillus* species in human keratomycosi, p. 293–328. *In* *Aspergillus in the genomic era*. Wageningen Academic Publishers, The Netherlands.
46. Manikandan P, Varga J, Kocsubé S, Anita R, Revathi R, Németh TM, Narendran V, Vágvölgyi C, Panneer Selvam K, Shobana CS, Babu Singh YR, Kredics L. 2013. Epidemiology of *Aspergillus* keratitis at a tertiary care eye hospital in South India and antifungal susceptibilities of the causative agents. *Mycoses* 56:26–33.
47. Denning DW, Cadranet J, Beigelman-Aubry C, Ader F, Chakrabarti A, Blot S, Ullmann AJ, Dimopoulos G, Lange C. 2016. Chronic pulmonary aspergillosis: rationale and clinical guidelines for diagnosis and management. *Eur Respir J* 47:45–68.
48. Bennett JH. 1844. *On the Parasitic Vegetable Structures found growing in Living Animals*. *Trans R Soc Edinb* 15:277–294.
49. Lamoth F, Juvvadi PR, Steinbach WJ. 2016. Editorial: Advances in *Aspergillus fumigatus* Pathobiology. *Front Microbiol* 7.
50. Gangneux J-P, Bougnoux M-E, Hennequin C, Godet C, Chandenier J, Denning DW, Dupont B. 2016. An estimation of burden of serious fungal infections in France. *Journal de Mycologie Médicale* 26:385–390.
51. Segal BH. 2009. Aspergillosis. *N Engl J Med* 360:1870–1884.
52. Camargo JF, Husain S. 2014. Immune Correlates of Protection in Human Invasive Aspergillosis. *Clinical Infectious Diseases* 59:569–577.
53. Herbrecht R, Bories P, Moulin J-C, Ledoux M-P, Letscher-Bru V. 2012. Risk stratification for invasive aspergillosis in immunocompromised patients: Risk stratification for invasive aspergillosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1272:23–30.
54. Lewis RE, Kontoyiannis DP. 2009. Invasive aspergillosis in glucocorticoid-treated patients. *Med Mycol* 47:S271–S281.
55. Imbert S, Bresler P, Boissonnas A, Gauthier L, Souchet L, Uzunov M, Leblond V, Mazier D, Nguyen S, Fekkar A. 2016. Calcineurin inhibitors impair neutrophil activity

against *Aspergillus fumigatus* in allogeneic hematopoietic stem cell transplant recipients. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138:860–868.

56. Lortholary O, Gangneux J-P, Sitbon K, Lebeau B, de Monbrison F, Le Strat Y, Coignard B, Dromer F, Bretagne S. 2011. Epidemiological trends in invasive aspergillosis in France: the SAIF network (2005–2007). *Clinical Microbiology and Infection* 17:1882–1889.

57. Pappas PG, Alexander BD, Andes DR, Hadley S, Kauffman CA, Freifeld A, Anaissie EJ, Brumble LM, Herwaldt L, Ito J, Kontoyiannis DP, Lyon GM, Marr KA, Morrison VA, Park BJ, Patterson TF, Perl TM, Oster RA, Schuster MG, Walker R, Walsh TJ, Wannemuehler KA, Chiller TM. 2010. Invasive Fungal Infections among Organ Transplant Recipients: Results of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET). *Clin infect dis* 50:1101–1111.

58. Kontoyiannis DP, Marr KA, Park BJ, Alexander BD, Anaissie EJ, Walsh TJ, Ito J, Andes DR, Baddley JW, Brown JM, Brumble LM, Freifeld AG, Hadley S, Herwaldt LA, Kauffman CA, Knapp K, Lyon GM, Morrison VA, Papanicolaou G, Patterson TF, Perl TM, Schuster MG, Walker R, Wannemuehler KA, Wingard JR, Chiller TM, Pappas PG. 2010. Prospective Surveillance for Invasive Fungal Infections in Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients, 2001–2006: Overview of the Transplant-Associated Infection Surveillance Network (TRANSNET) Database. *Clin infect dis* 50:1091–1100.

59. Neofytos D, Fishman JA, Horn D, Anaissie E, Chang C-H, Olyaei A, Pfaller M, Steinbach WJ, Webster KM, Marr KA. 2010. Epidemiology and outcome of invasive fungal infections in solid organ transplant recipients: Invasive fungal infections in SOT. *Transplant Infectious Disease* 12:220–229.

60. Steinbach WJ, Marr KA, Anaissie EJ, Azie N, Quan S-P, Meier-Kriesche H-U, Apewokin S, Horn DL. 2012. Clinical epidemiology of 960 patients with invasive aspergillosis from the PATH Alliance registry. *J Infect* 65:453–464.

61. Neofytos D, Horn D, Anaissie E, Steinbach W, Olyaei A, Fishman J, Pfaller M, Chang C, Webster K, Marr K. 2009. Epidemiology and Outcome of Invasive Fungal Infection in Adult Hematopoietic Stem Cell Transplant Recipients: Analysis of Multicenter Prospective Antifungal Therapy (PATH) Alliance Registry. *Clin infect dis* 48:265–273.

62. Meersseman W, Vandecasteele SJ, Wilmer A, Verbeken E, Peetermans WE, Van Wijngaerden E. 2004. Invasive Aspergillosis in Critically Ill Patients without Malignancy. *Am J Respir Crit Care Med* 170:621–625.

63. Taccone F, Van den Abeele A-M, Bulpa P, Misset B, Meersseman W, Cardoso T, Paiva J-A, Blasco-Navalpotro M, De Laere E, Dimopoulos G, Rello J, Vogelaers D, Blot SI,

on behalf of the AspICU Study Investigators. 2015. Epidemiology of invasive aspergillosis in critically ill patients: clinical presentation, underlying conditions, and outcomes. *Crit Care* 19:7.

64. Blot SI, Taccone FS, Van den Abeele A-M, Bulpa P, Meersseman W, Brusselsaers N, Dimopoulos G, Paiva JA, Misset B, Rello J, Vandewoude K, Vogelaers D. 2012. A Clinical Algorithm to Diagnose Invasive Pulmonary Aspergillosis in Critically Ill Patients. *Am J Respir Crit Care Med* 186:56–64.

65. Tudesq J-J, Peyrony O, Lemiale V, Azoulay E. 2019. Invasive Pulmonary Aspergillosis in Nonimmunocompromised Hosts. *Semin Respir Crit Care Med* 40:540–547.

66. Prodanovic H, Cracco C, Massard J, Barrault C, Thabut D, Duguet A, Datry A, Derenne J-P, Poynard T, Similowski T. 2007. Invasive pulmonary aspergillosis in patients with decompensated cirrhosis: case series. *BMC Gastroenterol* 7:2.

67. Azoulay E, Lemiale V, Mokart D, Pène F, Kouatchet A, Perez P, Vincent F, Mayaux J, Benoit D, Bruneel F, Meert A-P, Nyunga M, Rabbat A, Darmon M. 2014. Acute respiratory distress syndrome in patients with malignancies. *Intensive Care Med* 40:1106–1114.

68. Verweij PE, Rijnders BJA, Brüggemann RJM, Azoulay E, Bassetti M, Blot S, Calandra T, Clancy CJ, Cornely OA, Chiller T, Depuydt P, Giacobbe DR, Janssen NAF, Kullberg B-J, Lagrou K, Lass-Flörl C, Lewis RE, Liu PW-L, Lortholary O, Maertens J, Martin-Loeches I, Nguyen MH, Patterson TF, Rogers TR, Schouten JA, Spriet I, Vanderbeke L, Wauters J, van de Veerdonk FL. 2020. Review of influenza-associated pulmonary aspergillosis in ICU patients and proposal for a case definition: an expert opinion. *Intensive Care Med* 46:1524–1535.

69. Parcell BJ, B C Raju PK, Johnson EM, Fardon TC, Olver WJ. 2014. Invasive pulmonary aspergillosis post extracorporeal membrane oxygenation support and literature review. *Medical Mycology Case Reports* 4:12–15.

70. Blaize M, Mayaux J, Nabet C, Lampros A, Marcelin A-G, Thellier M, Piarroux R, Demoule A, Fekkar A. 2020. Fatal Invasive Aspergillosis and Coronavirus Disease in an Immunocompetent Patient. *Emerg Infect Dis* 26:1636–1637.

71. Ledoux M-P, Guffroy B, Nivoix Y, Simand C, Herbrecht R. 2020. Invasive Pulmonary Aspergillosis. *Semin Respir Crit Care Med* 41:080–098.

72. Nucci M, Nouer SA, Cappone D, Anaissie E. 2013. Early diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in hematologic patients: an opportunity to improve the outcome. *Haematologica* 98:1657–1660.

73. Bergeron A, Porcher R, Sulahian A, de Bazelaire C, Chagnon K, Raffoux E, Vekhoff

A, Cornet M, Isnard F, Brethon B, Lacroix C, Poirot JL, Bouges C, Derouin F, Tazi A, Ribaud P. 2012. The strategy for the diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis should depend on both the underlying condition and the leukocyte count of patients with hematologic malignancies. *Blood* 119:1831–1837.

74. Caillot D, Latrabe V, Thiébaud A, Herbrecht R, De Botton S, Pigneux A, Monchecourt F, Mahi L, Alfandari S, Couaillier J-F. 2010. Computer tomography in pulmonary invasive aspergillosis in hematological patients with neutropenia: An useful tool for diagnosis and assessment of outcome in clinical trials. *European Journal of Radiology* 74:e172–e175.

75. Slobbe L, Polinder S, Doorduyn JK, Lugtenburg PJ, el Barzouhi A, Steyerberg EW, Rijnders BJA. 2008. Outcome and Medical Costs of Patients with Invasive Aspergillosis and Acute Myelogenous Leukemia–Myelodysplastic Syndrome Treated with Intensive Chemotherapy: An Observational Study. *Clin infect dis* 47:1507–1512.

76. Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, Andes D, Kontoyiannis DP, Perrone G, Peterson S, Brandt ME, Pappas PG, Chiller T. 2009. Molecular Identification of *Aspergillus* Species Collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *Journal of Clinical Microbiology* 47:3138–3141.

77. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Rivero-Menéndez O, Ayats J, Castro C, García-Rodríguez J, Goterris-Bonet L, Ibáñez-Martínez E, Linares-Sicilia MJ, Martín-Gomez MT, Martín-Mazuelos E, Pelaez T, Peman J, Rezusta A, Rojo S, Tejero R, Anza DV, Viñuelas J, Zapico MS, Cuenca-Estrella M. 2018. Molecular Identification and Susceptibility Testing of Molds Isolated in a Prospective Surveillance of Triazole Resistance in Spain (FILPOP2 Study). *Antimicrob Agents Chemother* 62:e00358-18, /aac/62/9/e00358-18.atom.

78. Cho S-Y, Lee D-G, Kim W-B, Chun H-S, Park C, Myong J-P, Park Y-J, Choi J-K, Lee H-J, Kim S-H, Park SH, Choi S-M, Choi J-H, Yoo J-H. 2019. Epidemiology and Antifungal Susceptibility Profile of *Aspergillus* Species: Comparison between Environmental and Clinical Isolates from Patients with Hematologic Malignancies. *J Clin Microbiol* 57:e02023-18, /jcm/57/7/JCM.02023-18.atom.

79. Tsang C-C, Tang JYM, Lau SKP, Woo PCY. 2018. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. *Computational and Structural Biotechnology Journal* 16:197–210.

80. Zhang L, Wang X, Houbraken J, Mei H, Liao W, Hasimu H, Liu W, Deng S. 2020. Molecular Identification and In Vitro Antifungal Susceptibility of *Aspergillus* Isolates Recovered from Otomycosis Patients in Western China. *Mycopathologia* 185:527–535.

81. Hagiwara S, Tamura T, Satoh K, Kamewada H, Nakano M, Shinden S, Yamaguchi H,

- Makimura K. 2019. The Molecular Identification and Antifungal Susceptibilities of *Aspergillus* Species Causing Otomycosis in Tochigi, Japan. *Mycopathologia* 184:13–21.
82. Castro C, Galán-Sánchez F, Linares MJ, Tejero R, Ruiz M, Serrano ML, Rodríguez-Iglesias M, Martín-Mazuelos E, The FUNGAE-IFI Study Group. 2019. A prospective survey of *Aspergillus* spp. in respiratory tract samples: Species identification and susceptibility patterns. *Medical Mycology* 57:412–420.
83. Bongomin F, Moore CB, Masania R, Rowbotham E, Alastruey-Izquierdo A, Novak-Frazer L, Richardson MD. 2018. Sequence analysis of isolates of *Aspergillus* from patients with chronic and allergic aspergillosis reveals a spectrum of cryptic species. *Future Microbiol* 13:1557–1563.
84. Devoto TB, Alava KSH, Pola SJ, Pereda R, Ruboglio E, Finkelievich JL, Cuestas ML. 2020. Molecular epidemiology of *Aspergillus* species and other moulds in respiratory samples from Argentinean patients with cystic fibrosis. *Medical Mycology* myz133.
85. Symoens F, Haase G, Pihet M, Carrere J, Beguin H, Degand N, Mely L, Bouchara J-P. 2010. Unusual *Aspergillus* species in patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* 48:S10–S16.
86. Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, FILPOP Study Group. 2013. Population-Based Survey of Filamentous Fungi and Antifungal Resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother* 57:3380–3387.
87. Pinto E, Monteiro C, Maia M, Faria MA, Lopes V, Lameiras C, Pinheiro D. 2018. *Aspergillus* Species and Antifungals Susceptibility in Clinical Setting in the North of Portugal: Cryptic Species and Emerging Azoles Resistance in *A. fumigatus*. *Front Microbiol* 9:1656.
88. Vidal-Acuña MR, Ruiz M, Torres MJ, Aznar J. 2019. Prevalence and in vitro antifungal susceptibility of cryptic species of the genus *Aspergillus* isolated in clinical samples. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 37:296–300.
89. Gautier M, Normand A-C, Ranque S. 2016. Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clinical Microbiology and Infection* 22:662–669.
90. von Eiff M, Roos N, Schulten R, Hesse M, Zühlendorf M, van de Loo J. 1995. Pulmonary Aspergillosis: Early Diagnosis Improves Survival. *Respiration* 62:341–347.
91. Rivero-Menendez O, Soto-Debran JC, Medina N, Lucio J, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A. 2019. Molecular Identification, Antifungal Susceptibility Testing, and Mechanisms of Azole Resistance in *Aspergillus* Species Received within a Surveillance Program on Antifungal Resistance in Spain. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00865-19,

/aac/63/9/AAC.00865-19.atom.

92. Rivero-Menendez O, Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A. 2019. In vitro activity of olorofim (F901318) against clinical isolates of cryptic species of *Aspergillus* by EUCAST and CLSI methodologies. *J Antimicrob Chemother* 74:1586–1590.
93. EUCAST_E_Def_9_3_1_Mould_testing__definitive.pdf.
94. Alexander BD, Clinical and Laboratory Standards Institute. 2017. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi.
95. Buil JB, van der Lee H a. L, Rijs AJMM, Zoll J, Hovestadt J a. MF, Melchers WJG, Verweij PE. 2017. Single-Center Evaluation of an Agar-Based Screening for Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus* by Using VIPcheck. *Antimicrob Agents Chemother* 61.
96. Arendrup MC, Verweij PE, Mouton JW, Lagrou K, Meletiadis J. 2017. Multicentre validation of 4-well azole agar plates as a screening method for detection of clinically relevant azole-resistant *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 72:3325–3333.
97. Guinea J, Verweij PE, Meletiadis J, Mouton JW, Barchiesi F, Arendrup MC, Arendrup MC, Arikani-Akdagli S, Barchiesi F, Castanheira M, Chryssanthou E, Friberg N, Guinea J, Järv H, Klimko N, Kurzai O, Lagrou K, Lass-Flörl C, Mares M, Matos T, Meletiadis J, Moore CB, Mouton JW, Muehlethaler K, Rogers TR, Andersen CT, Velegraki A. 2019. How to: EUCAST recommendations on the screening procedure E.Def 10.1 for the detection of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates using four-well azole-containing agar plates. *Clinical Microbiology and Infection* 25:681–687.
98. AFST_BP_v10.0_200204.pdf.
99. Espinel-Ingroff A, Turnidge J, Alastruey-Izquierdo A, Botterel F, Canton E, Castro C, Chen Y-C, Chen Y, Chryssanthou E, Dannaoui E, Garcia-Effron G, Gonzalez GM, Govender NP, Guinea J, Kidd S, Lackner M, Lass-Flörl C, Linares-Sicilia MJ, López-Soria L, Magobo R, Pelaez T, Quindós G, Rodriguez-Iglesia MA, Ruiz MA, Sánchez-Reus F, Sanguinetti M, Shields R, Szweda P, Tortorano A, Wengenack NL, Bramati S, Cavanna C, DeLuca C, Gelmi M, Grancini A, Lombardi G, Meletiadis J, Negri CE, Passera M, Peman J, Prigitano A, Sala E, Tejada M. 2019. Method-Dependent Epidemiological Cutoff Values for Detection of Triazole Resistance in *Candida* and *Aspergillus* Species for the Sensititre YeastOne Colorimetric Broth and Etest Agar Diffusion Methods. *Antimicrob Agents Chemother* 63.
100. Espinel-Ingroff A, Diekema DJ, Fothergill A, Johnson E, Pelaez T, Pfaller MA, Rinaldi MG, Canton E, Turnidge J. 2010. Wild-type MIC distributions and epidemiological cutoff values for the triazoles and six *Aspergillus* spp. for the CLSI broth microdilution method (M38-A2 document). *J Clin Microbiol* 48:3251–3257.

101. Alastruey-Izquierdo A, Cuesta I, Houbraken J, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL. 2010. *In vitro* activity of nine antifungal agents against clinical isolates of *Aspergillus calidoustus*. *Med Mycol* 48:97–102.
102. Siqueira JPZ, Sutton DA, Gené J, García D, Wiederhold N, Peterson SW, Guarro J. 2017. Multilocus Phylogeny and Antifungal Susceptibility of *Aspergillus* Section *Circumdati* from Clinical Samples and Description of *A. pseudosclerotiorum* sp. nov. *J Clin Microbiol* 55:947–958.
103. Lamoth F. 2016. *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Front Microbiol* 7.
104. Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodríguez-Tudela JL. 2008. *Aspergillus* Section *Fumigati*: Antifungal Susceptibility Patterns and Sequence-Based Identification. *AAC* 52:1244–1251.
105. Lyskova P, Hubka V, Svobodova L, Barrs V, Dhand NK, Yaguchi T, Matsuzawa T, Horie Y, Kolarik M, Dobias R, Hamal P. 2018. Antifungal Susceptibility of the *Aspergillus viridinutans* Complex: Comparison of Two *In Vitro* Methods. *Antimicrob Agents Chemother* 62:e01927-17.
106. Talbot JJ, Frisvad JC, Meis JF, Hagen F, Verweij PE, Hibbs DE, Lai F, Groundwater PW, Samson RA, Kidd SE, Barrs VR, Houbraken J. 2019. *cyp51A* Mutations, Extrolite Profiles, and Antifungal Susceptibility in Clinical and Environmental Isolates of the *Aspergillus viridinutans* Species Complex. *Antimicrob Agents Chemother* 63:e00632-19, /aac/63/11/AAC.00632-19.atom.
107. Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M. 2014. Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia* 178:427–433.
108. Carrara B, Richards R, Imbert S, Morio F, Sasso M, Zahr N, Normand AC, Le Pape P, Lachaud L, Ranque S, Maubon D, Piarroux R, Fekkar A. 2020. Species Distribution and Comparison between EUCAST and Gradient Concentration Strips Methods for Antifungal Susceptibility Testing of 112 *Aspergillus* Section *Nigri* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* AAC.02510-19, aac;AAC.02510-19v1.
109. Iatta R, Nuccio F, Immediato D, Mosca A, De Carlo C, Miragliotta G, Parisi A, Crescenzo G, Otranto D, Cafarchia C. 2016. Species Distribution and *In Vitro* Azole Susceptibility of *Aspergillus* Section *Nigri* Isolates from Clinical and Environmental Settings. *J Clin Microbiol* 54:2365–2372.
110. Van Der Linden JWM, Warris A, Verweij PE. 2011. *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med Mycol* 49:S82–S89.

111. Howard SJ. 2014. Multi-Resistant Aspergillosis due to Cryptic Species. *Mycopathologia* 178:435–439.
112. Negri CE, Goncalves SS, Xafranski H, Bergamasco MD, Aquino VR, Castro PTO, Colombo AL. 2014. Cryptic and Rare Aspergillus Species in Brazil: Prevalence in Clinical Samples and In Vitro Susceptibility to Triazoles. *Journal of Clinical Microbiology* 52:3633–3640.
113. Vermeulen E, Lagrou K, Verweij PE. 2013. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus*: a growing public health concern. *Curr Opin Infect Dis* 26:493–500.
114. Verweij PE, Chowdhary A, Melchers WJG, Meis JF. 2016. Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles? *Clin Infect Dis* 62:362–368.
115. Lestrade PPA, Meis JF, Melchers WJG, Verweij PE. 2019. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*: recent insights and challenges for patient management. *Clin Microbiol Infect* 25:799–806.
116. Arendrup MC, Jensen RH, Grif K, Skov M, Pressler T, Johansen HK, Lass-Flörl C. 2012. In vivo emergence of *Aspergillus terreus* with reduced azole susceptibility and a Cyp51a M217I alteration. *J Infect Dis* 206:981–985.
117. Pérez-Cantero A, López-Fernández L, Guarro J, Capilla J. 2020. Azole resistance mechanisms in *Aspergillus*: update and recent advances. *Int J Antimicrob Agents* 55:105807.
118. Hagiwara D, Watanabe A, Kamei K, Goldman GH. 2016. Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus* Fungi. *Front Microbiol* 7.
119. van Ingen J, van der Lee HA, Rijs TAJ, Zoll J, Leenstra T, Melchers WJG, Verweij PE. 2015. Azole, polyene and echinocandin MIC distributions for wild-type, TR34/L98H and TR46/Y121F/T289A *Aspergillus fumigatus* isolates in the Netherlands. *J Antimicrob Chemother* 70:178–181.
120. Meneau I, Coste AT, Sanglard D. 2016. Identification of *Aspergillus fumigatus* multidrug transporter genes and their potential involvement in antifungal resistance. *Med Mycol* 54:616–627.
121. Fraczek MG, Bromley M, Buied A, Moore CB, Rajendran R, Rautemaa R, Ramage G, Denning DW, Bowyer P. 2013. The *cdr1B* efflux transporter is associated with non-*cyp51a*-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother* 68:1486–1496.
122. Rybak JM, Ge W, Wiederhold NP, Parker JE, Kelly SL, Rogers PD, Fortwendel JR.

2019. Mutations in *hmg1*, Challenging the Paradigm of Clinical Triazole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *mBio* 10.
123. Mellado E, Alcazar-Fuoli L, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. 2011. Role of *Aspergillus lentulus* 14- α Sterol Demethylase (Cyp51A) in Azole Drug Susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother* 55:5459–5468.
124. Parent-Michaud M, Dufresne PJ, Fournier E, Folch B, Martineau C, Moreira S, Doucet N, De Repentigny L, Dufresne SF. 2020. Prevalence and mechanisms of azole resistance in clinical isolates of *Aspergillus* section *Fumigati* species in a Canadian tertiary care centre, 2000 to 2013. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 75:849–858.
125. Vahedi Shahandashti R, Lass-Flörl C. 2019. Antifungal resistance in *Aspergillus terreus*: A current scenario. *Fungal Genet Biol* 131:103247.
126. Cassagne C, Ranque S, Normand A-C, Fourquet P, Thiebault S, Planard C, Hendrickx M, Piarroux R. 2011. Mould routine identification in the clinical laboratory by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *PLoS ONE* 6:e28425.
127. EUCAST_AFST_QC_v_4.0_200204.pdf.
128. Chen AJ, Frisvad JC, Sun BD, Varga J, Kocsubé S, Dijksterhuis J, Kim DH, Hong S-B, Houbroken J, Samson RA. 2016. *Aspergillus* section *Nidulantes* (formerly *Emericella*): Polyphasic taxonomy, chemistry and biology. *Stud Mycol* 84:1–118.
129. Barrs VR, van Doorn TM, Houbroken J, Kidd SE, Martin P, Pinheiro MD, Richardson M, Varga J, Samson RA. 2013. *Aspergillus felis* sp. nov., an emerging agent of invasive aspergillosis in humans, cats, and dogs. *PLoS ONE* 8:e64871.
130. Talbot JJ, Barrs VR. 2018. One-health pathogens in the *Aspergillus viridinutans* complex. *Med Mycol* 56:1–12.
131. Hubka V, Barrs V, Dudová Z, Sklenář F, Kubátová A, Matsuzawa T, Yaguchi T, Horie Y, Nováková A, Frisvad JC, Talbot JJ, Kolařík M. 2018. Unravelling species boundaries in the *Aspergillus viridinutans* complex (section *Fumigati*): opportunistic human and animal pathogens capable of interspecific hybridization. *Persoonia* 41:142–174.
132. Visagie CM, Houbroken J. 2020. Updating the taxonomy of *Aspergillus* in South Africa. *Stud Mycol* 95:253–292.
133. Chrenkova V, Hubka V, Cetkovsky P, Kouba M, Weinbergerova B, Lyskova P, Hornofova L, Hubacek P. 2018. Proven Invasive Pulmonary Aspergillosis in Stem Cell Transplant Recipient Due to *Aspergillus sublatus*, a Cryptic Species of *A. nidulans*. *Mycopathologia* 183:423–429.
134. M Américo F, P Machado Siqueira L, B Del Negro GM, M Favero Gimenes V, S

- Trindade MR, L Motta A, Santos de Freitas R, Rossi F, L Colombo A, Benard G, N de Almeida Júnior J. 2020. Evaluating VITEK MS for the identification of clinically relevant *Aspergillus* species. *Med Mycol* 58:322–327.
135. Imbert S, Normand AC, Ranque S, Costa JM, Guitard J, Accoceberry I, Bonnal C, Fekkar A, Bourgeois N, Houzé S, Hennequin C, Piarroux R, Dannaoui E, Botterel F. 2018. Species Identification and In Vitro Antifungal Susceptibility of *Aspergillus terreus* Species Complex Clinical Isolates from a French Multicenter Study. *Antimicrob Agents Chemother* 62.
136. Dellière S, Verdurme L, Bigot J, Dannaoui E, Senghor Y, Botterel F, Fekkar A, Bougnoux ME, Hennequin C, Guitard J. 2019. Comparison of the MICs Obtained by Gradient Concentration Strip and EUCAST Methods for Four Azole Drugs and Amphotericin B against Azole-Susceptible and -Resistant *Aspergillus* Section *Fumigati* Clinical Isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 64:e01597-19, /aac/64/3/AAC.01597-19.atom.
137. Meletiadiis J, Siopi M, Kanioura L, Jørgensen KM, Perlin DS, Mouton JW, Arendrup MC. 2020. A multicentre study to optimize echinocandin susceptibility testing of *Aspergillus* species with the EUCAST methodology and a broth microdilution colorimetric method. *J Antimicrob Chemother* 75:1799–1806.
138. Morio F, Lombardi L, Binder U, Loge C, Robert E, Graessle D, Bodin M, Lass-Flörl C, Butler G, Le Pape P. 2019. Precise genome editing using a CRISPR-Cas9 method highlights the role of CoERG11 amino acid substitutions in azole resistance in *Candida orthopsilosis*. *J Antimicrob Chemother* 74:2230–2238.
139. Ballard E, Weber J, Melchers WJG, Tammireddy S, Whitfield PD, Brakhage AA, Brown AJP, Verweij PE, Warris A. 2019. Recreation of in-host acquired single nucleotide polymorphisms by CRISPR-Cas9 reveals an uncharacterised gene playing a role in *Aspergillus fumigatus* azole resistance via a non-cyp51A mediated resistance mechanism. *Fungal Genet Biol* 130:98–106.
140. Jemel S, Guillot J, Kallel K, Botterel F, Dannaoui E. 2020. *Galleria mellonella* for the Evaluation of Antifungal Efficacy against Medically Important Fungi, a Narrative Review. *Microorganisms* 8.
141. Glampedakis E, Cassaing S, Fekkar A, Dannaoui E, Bougnoux M-E, Bretagne S, Neofytos D, Schreiber PW, Hennequin C, Morio F, Shadrivova O, Bongomin F, Fernández-Ruiz M, Bellanger AP, Arikani-Akdagli S, Erard V, Aigner M, Paolucci M, Khanna N, Charpentier E, Bonnal C, Brun S, Gabriel F, Riat A, Zbinden R, Le Pape P, Klimko N, Lewis RE, Richardson M, İnkaya AC, Coste AT, Bochud P-Y, Lamoth F. 2020. Invasive

aspergillosis due to *Aspergillus* section Usti: a multicenter retrospective study. *Clin Infect Dis* <https://doi.org/10.1093/cid/ciaa230>.

142. Parent-Michaud M, Dufresne PJ, Fournier É, Martineau C, Moreira S, Perkins V, de Repentigny L, Dufresne SF. 2019. Draft Genome Sequence of Azole-Resistant *Aspergillus t hermomutatus* (*Neosartorya pseudofischeri*) Strain HMR-AF-39, Isolated from a Human Nasal Septum Abscess Aspirate. *Microbiol Resour Announc* 8:e01444-18, /mra/8/1/e01444-18.atom.

143. Lamoth F, Chung SJ, Damonti L, Alexander BD. 2017. Changing Epidemiology of Invasive Mold Infections in Patients Receiving Azole Prophylaxis. *Clin Infect Dis* 64:1619–1621.

Annexes

Annexe 1 : souches de référence et numéro d'accèsion dans Genbank des séquences utilisées pour la construction des arbres phylogénétiques

Section	Espèce	Souche de référence	Numéro d'accèsion dans Genbank			
			ITS	<i>benA</i>	<i>cmd</i>	<i>rpb2</i>
<i>Aspergillus</i>	<i>A. aerius</i>	CBS 141771	LT670916	LT670990	LT670991	LT670992
<i>Aspergillus</i>	<i>A. appendiculatus</i>	CBS 374.75	HE615132	HE801333	HE801318	HE801307
<i>Aspergillus</i>	<i>A. aurantiocoflavus</i>	CBS 141930	LT670917	LT670993	LT670994	LT670995
<i>Aspergillus</i>	<i>A. brunneus</i>	CBS 112.26	EF652060	EF651907	EF651998	EF651939
<i>Aspergillus</i>	<i>A. caperatus</i>	CBS 141774	LT670922	LT671008	LT671009	LT671010
<i>Aspergillus</i>	<i>A. chevalieri</i>	CBS 522.65	EF652068	EF651911	EF652002	EF651954
<i>Aspergillus</i>	<i>A. cibarius</i>	KACC 46346	JQ918177	JQ918180	JQ918183	JQ918186
<i>Aspergillus</i>	<i>A. costiformis</i>	CBS 101749	HE615136	HE801338	HE801320	HE801309
<i>Aspergillus</i>	<i>A. cristatus</i>	CBS 123.53	EF652078	EF651914	EF652001	EF651957
<i>Aspergillus</i>	<i>A. cumulatus</i>	KACC 47316	KF928303	KF928297	KF928300	KF928294
<i>Aspergillus</i>	<i>A. endophyticus</i>	CBS 141766	LT670941	LT671067	LT671068	LT671069
<i>Aspergillus</i>	<i>A. glaucus</i>	CBS 516.65	EF652052	EF651887	EF651989	EF651934
<i>Aspergillus</i>	<i>A. intermedius</i>	CBS 523.65	EF652074	EF651892	EF652012	EF651958
<i>Aspergillus</i>	<i>A. leucocarpus</i>	CBS 353.68	EF652087	EF651925	EF652023	EF651972
<i>Aspergillus</i>	<i>A. mallochii</i>	CBS 141928	KX450907	KX540889	KX450902	KX450894
<i>Aspergillus</i>	<i>A. megasporus</i>	CBS 141929	KX540910	KX450892	KX450905	KX450897
<i>Aspergillus</i>	<i>A. montevidensis</i>	CBS 491.65	EF652077	EF651898	EF652020	EF651964
<i>Aspergillus</i>	<i>A. neocarnoyi</i>	CBS 471.65	EF652057	EF651903	EF651985	EF651942
<i>Aspergillus</i>	<i>A. niveoglaucus</i>	CBS 114.27	EF652058	EF651905	EF651993	EF651943
<i>Aspergillus</i>	<i>A. osmophilus</i>	CBS 134258	KC473921	KC473924	KC473918	
<i>Aspergillus</i>	<i>A. proliferans</i>	CBS 121.45	EF652064	EF651891	EF651988	EF651941
<i>Aspergillus</i>	<i>A. pseudoglaucus</i>	CBS 123.28	EF652050	EF651917	EF652007	EF651952
<i>Aspergillus</i>	<i>A. ruber</i>	CBS 530.65	EF652066	EF651920	EF652009	EF651947
<i>Aspergillus</i>	<i>A. sloanii</i>	CBS 138177	KJ775540	KJ775074	KJ775309	
<i>Aspergillus</i>	<i>A. tonophilus</i>	CBS 405.65	EF652081	EF651919	EF652000	EF651969
<i>Aspergillus</i>	<i>A. xerophilus</i>	CBS 938.73	EF652085	EF651923	EF651983	EF651970
<i>Aspergillus</i>	<i>A. zutongqii</i>	CBS 141773	LT670986	LT671206	LT671207	LT671208
<i>Aspergillus</i>	<i>A. levisporus</i>	CBS 141767	LT670950	LT671094	LT671095	LT671096
<i>Aspergillus</i>	<i>A. microperforatus</i>	CBS 142376	LT627271	LT627296	LT627321	LT627346
<i>Aspergillus</i>	<i>A. porosus</i>	CBS 141770	LT670961	LT671130	LT671131	LT671132
<i>Aspergillus</i>	<i>A. tamarindosoli</i>	CBS 141775	LT670981	LT671191	LT671192	LT671193
<i>Aspergillus</i>	<i>A. teporis</i>	CBS 141768	LT670982	LT671194	LT671195	LT671196
<i>Candidi</i>	<i>A. campestris</i>	CBS 348.81	EF669577	EU014091	EF669535	EF669619
<i>Candidi</i>	<i>A. candidus</i>	CBS 566.65	EF669592	EU014089	EF669550	EF669634
<i>Candidi</i>	<i>A. pragensis</i>	CBS 135591	FR727138	HE661604	FR751452	
<i>Candidi</i>	<i>A. subalbidus</i>	CBS 567.65	KJ866983	EU076295	EF669551	
<i>Candidi</i>	<i>A. taichungensis</i>	IBT 19404	EU076301	EU076297	EU076310	
<i>Candidi</i>	<i>A. tritici</i>	CBS 266.81	EU076302	EU076293	EU076305	
<i>Candidi</i>	<i>A. dobrogensis</i>	CCF4651	LT626959	LT627027	LT558722	LT627028

<i>Candidi</i>	<i>A. coprophilus</i>	CBS142985	LT798903	LT798918	LT798919	LT798920
<i>Candidi</i>	<i>A. cf. subalbidus</i>	PPRI6060	MK450633	MK451000	MK451330	
<i>Candidi</i>	<i>A. verruculosus</i>	CBS142667	LT798907	LT798930	LT798931	LT798932
<i>Circumdati</i>	<i>A. affinis</i>	CBS 129190	GU721090	GU721092	GU721091	
<i>Circumdati</i>	<i>A. auricomus</i>	CBS 467.65	EF661411	EF661320	EF661379	EF661300
<i>Circumdati</i>	<i>A. bridgeri</i>	CBS 350.81	EF661404	EF661335	EF661358	EF661290
<i>Circumdati</i>	<i>A. cretensis</i>	CBS 112802	FJ491572	AY819977	FJ491534	EF661311
<i>Circumdati</i>	<i>A. elegans</i>	CBS 102.14	EF661414	EF661349	EF661390	EF661316
<i>Circumdati</i>	<i>A. fresenii</i>	CBS 550.65	EF661409	EF661341	EF661382	EF661296
<i>Circumdati</i>	<i>A. insulicola</i>	CBS 382.75	EF661430	EF661353	EF661396	EF661286
<i>Circumdati</i>	<i>A. melleus</i>	CBS 546.65	EF661425	EF661326	EF661391	EF661309
<i>Circumdati</i>	<i>A. muricatus</i>	CBS 112808	EF661434	EF661356	EF661377	EF661314
<i>Circumdati</i>	<i>A. neobridgeri</i>	CBS 559.82	EF661410	EF661345	EF661359	EF661298
<i>Circumdati</i>	<i>A. occultus</i>	CBS 137330	KJ775443	KJ775061	KJ775239	
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceopetaliformis</i>	CBS 123.55	EF661429	EF661350	EF661388	EF661283
<i>Circumdati</i>	<i>A. ochraceus</i>	CBS 108.08	EF661419	EF661322	EF661381	EF661302
<i>Circumdati</i>	<i>A. ostianus</i>	CBS 103.07	EF661421	EF661324	EF661385	EF661304
<i>Circumdati</i>	<i>A. pallidofulvus</i>	CBS 640.78	EF661423	EF661328	EF661389	EF661306
<i>Circumdati</i>	<i>A. persii</i>	CBS 112795	FJ491580	AY819988	FJ491559	EF661295
<i>Circumdati</i>	<i>A. pseudoelegans</i>	CBS 112796	FJ491590	AY819962	FJ491552	EF661281
<i>Circumdati</i>	<i>A. pseudosclerotiorum</i>	CBS 141845	LT574713	LT574748	LT574783	LT574818
<i>Circumdati</i>	<i>A. pulvericola</i>	CBS 137327	KJ775440	KJ775055	KJ775236	
<i>Circumdati</i>	<i>A. roseoglobulosus</i>	CBS 112800	FJ491583	AY819984	FJ491555	EF661299
<i>Circumdati</i>	<i>A. salwaensis</i>	CBS 138172	KJ775447	KJ775056	KJ775244	
<i>Circumdati</i>	<i>A. sclerotiorum</i>	CBS 549.65	EF661400	EF661337	EF661384	EF661287
<i>Circumdati</i>	<i>A. sesamicola</i>	CBS 137324	KJ775437	KJ775063	KJ775233	
<i>Circumdati</i>	<i>A. steynii</i>	CBS 112812	EF661416	EF661347	EF661378	JN121428
<i>Circumdati</i>	<i>A. subramanianii</i>	CBS 138230	EF661403	EF661339	EF661397	EF661289
<i>Circumdati</i>	<i>A. westerdijkiae</i>	CBS 112803	EF661427	EF661329	EF661360	EF661307
<i>Circumdati</i>	<i>A. westlandensis</i>	CBS 137321	KJ775434	KJ775066	KJ775230	
<i>Clavati</i>	<i>A. giganteus</i>	CBS 526.65	EF669928	EF669789	EF669857	EF669716
<i>Clavati</i>	<i>A. clavatus</i>	CBS 513.65	EF669942	EF669802	EF669871	EF669730
<i>Clavati</i>	<i>A. acanthosporus</i>	CBS 558.71	EU078625	EU076322	EU078676	EF669779
<i>Clavati</i>	<i>A. clavatonanicus</i>	CBS 474.65	EF669986	EF669842	EF669912	EF669773
<i>Clavati</i>	<i>A. longivesica</i>	CBS 530.71	EF669991	EF669847	EF669917	EF669778
<i>Clavati</i>	<i>A. rhizopodus</i>	CBS 450.75	EU078652	EU076327	EF669926	
<i>Clavati</i>	<i>A. posadensis</i>	CBS 134259	HG529483	HG529481	HG529488	HF954977
<i>Clavati</i>	<i>A. seiferti</i>	PPRI3211	MK450647	MK451093	MK451509	MK450800
<i>Cremei</i>	<i>A. tardus</i>	CBS 433.93	FJ531045	FJ531001	FJ531084	
<i>Cremei</i>	<i>A. arxii</i>	CBS 525.83	MN431361	MN969365	MN969223	JN121529
<i>Cremei</i>	<i>A. brunneouniseriatus</i>	CBS 127.61	EF652141	EF652123	EF652138	EF652089
<i>Cremei</i>	<i>A. chrysellus</i>	CBS 472.65	EF652155	EF652109	EF652136	EF652090
<i>Cremei</i>	<i>A. citrocrescens</i>	CBS 140566	FR727121	FR775317	LN878969	
<i>Cremei</i>	<i>A. cremeus</i>	CBS 477.65	EF652149	EF652120	EF652125	EF652101
<i>Cremei</i>	<i>A. dimorphicus</i>	CBS 649.74	EF652154	EF652111	EF652135	EF652096
<i>Cremei</i>	<i>A. europaeus</i>	CBS 134393	LN908996	LN909006	LN909007	

<i>Cremei</i>	<i>A. flashentraegeri</i>	CBS 108.63	EF652150	EF652113	EF652130	EF652102
<i>Cremei</i>	<i>A. gorakhpurensis</i>	CBS 648.74	EF652145	EF652114	EF652126	EF652097
<i>Cremei</i>	<i>A. inflatus</i>	CBS 682.70	FJ531054	FJ531008	FJ531090	JN406529
<i>Cremei</i>	<i>A. itaconicus</i>	CBS 115.32	EF652147	EF652118	EF652140	EF652103
<i>Cremei</i>	<i>A. koreanus</i>	EML-GSNP1-1	KX216525	KX216530	KX216528	KX216531
<i>Cremei</i>	<i>A. pulvinus</i>	CBS 578.65	EF652159	EF652121	EF652139	EF652104
<i>Cremei</i>	<i>A. sepultus</i>	CBS 257.85	FJ531074	FJ531023	FJ531101	
<i>Cremei</i>	<i>A. stromatoides</i>	CBS 500.65	EF652146	EF652122	EF652127	EF652098
<i>Cremei</i>	<i>A. wentii</i>	CBS 104.07	EF652151	EF652106	EF652131	EF652092
<i>Cremei</i>	<i>A. esporlensis</i>	CBS142750	LT798908	LT798933	LT798934	LT798935
<i>Cremei</i>	<i>A. chaetosartoryae</i>	CBS 265.73	EF652144	EF652117	EF652129	EF652099
<i>Flavi</i>	<i>A. alliaceus</i>	CBS 536.65	EF661551	EF661465	EF661534	MG517825
<i>Flavi</i>	<i>A. arachidicola</i>	CBS 117610	EF409241	EF203158	EF202049	MG517802
<i>Flavi</i>	<i>A. avenaceus</i>	CBS 109.46	AF104446	FJ491481	FJ491496	JN121424
<i>Flavi</i>	<i>A. bertholletius</i>	CCT 7615	JX198673	MG517689	JX198674	MG517880
<i>Flavi</i>	<i>A. caelatus</i>	CBS 763.97	AF004930	EF661470	EF661522	EF661436
<i>Flavi</i>	<i>A. coremiformis</i>	CBS 553.77	EF661544	EU014104	EU014112	EU021623
<i>Flavi</i>	<i>A. flavus</i>	CBS 569.65	AF027863	EF661485	EF661508	EF661440
<i>Flavi</i>	<i>A. lanosus</i>	CBS 650.74	EF661553	MG517633	EF661539	EU021642
<i>Flavi</i>	<i>A. leporis</i>	CBS 151.66	AF104443	EF661499	EF661541	EF661459
<i>Flavi</i>	<i>A. minisclerotigenes</i>	CBS 117635	EF409239	EF203148	MG518009	MG517799
<i>Flavi</i>	<i>A. mottae</i>	CBS 130016	JF412767	HM803086	MG518058	MG517878
<i>Flavi</i>	<i>A. nomius</i>	CBS 260.88	AF027860	AF255067	AY017588	EF661456
<i>Flavi</i>	<i>A. oryzae</i>	CBS 102.07	EF661560	EF661483	EF661506	EF661438
<i>Flavi</i>	<i>A. parasiticus</i>	CBS 100926	AY373859	EF661481	AY017584	EF661449
<i>Flavi</i>	<i>A. pseudocaelatus</i>	CBS 117616	EF409242	MG517626	MG517995	MG517809
<i>Flavi</i>	<i>A. pseudonomius</i>	CBS 119388	AF338643	EF661495	EF661529	EF661454
<i>Flavi</i>	<i>A. pseudotamarii</i>	CBS 766.97	AF272574	EF203125	EF202030	EU021631
<i>Flavi</i>	<i>A. sergii</i>	CBS 130017	JF412769	HM803082	HM803029	HM802985
<i>Flavi</i>	<i>A. tamarii</i>	CBS 104.13	AF004929	EF661474	EF661526	EU021629
<i>Flavi</i>	<i>A. togoensis</i>	CBS 205.75	AJ874113	FJ491477	FJ491489	JN121479
<i>Flavi</i>	<i>A. transmontanensis</i>	CBS 130015	JF412774	HM803101	HM803020	HM802980
<i>Flavi</i>	<i>A. hancockii</i>	FRR 3425	KX858342	MBFL01001228	MBFL01000377	
<i>Flavi</i>	<i>A. aflatoxiformans</i>	CBS143679	MG662388	MG517706	MG518076	MG517897
<i>Flavi</i>	<i>A. aspearensis</i>	CBS143672	MG662398	MG517669	MG518040	MG517857
<i>Flavi</i>	<i>A. austwickii</i>	CBS143677	MG662391	MG517702	MG518072	MG517893
<i>Flavi</i>	<i>A. cerealis</i>	CBS143674	MG662394	MG517693	MG518063	MG517884
<i>Flavi</i>	<i>A. luteovirescens</i>	CBS620.95	MG662406	MG517625	MG517998	MG517808
<i>Flavi</i>	<i>A. neoalliaceus</i>	CBS143681	MH279420	MG517763	MG518133	MG517954
<i>Flavi</i>	<i>A. novoparasiticus</i>	CBS126849	MG662397	MG517684	MG518055	MG517875
<i>Flavi</i>	<i>A. pipericola</i>	CBS143680	MG662385	MG517717	MG518087	MG517908
<i>Flavi</i>	<i>A. sojae</i>	CBS100928	KJ175434	KJ175494	KJ175550	MG517831
<i>Flavi</i>	<i>A. subflavus</i>	CBS143683	MH279429	MG517773	MG518143	MG517964
<i>Flavi</i>	<i>A. vandermerwei</i>	CBS 612.78	EF661567	EF661469	EF661540	MG517838
<i>Flavi</i>	<i>A. texensis</i>	NRRL66855T		MK119752	MK119718	
<i>Flavi</i>	<i>A. krugeri</i>	PPRI8986T	MK450655	MK451098	MK451517	MK450808

<i>Flavi</i>	<i>A. magaliesburgensis</i>	PPRI6165T	MK450649	MK451116	MK451511	MK450802
<i>Flavipedes</i>	<i>A. ardalensis</i>	CBS 134372	FR733808	HG916683	HG916725	HG916704
<i>Flavipedes</i>	<i>A. capensis</i>	CBS 138188	KJ775550	KJ775072	KJ775279	KP987020
<i>Flavipedes</i>	<i>A. flavipes</i>	NRRL 302	EF669591	EU014085	EF669549	EF669633
<i>Flavipedes</i>	<i>A. iizukae</i>	CBS 541.69	EF669597	EU014086	EF669555	EF669639
<i>Flavipedes</i>	<i>A. luppi</i>	CBS 653.74	EF669617	EU014079	EF669575	EF669659
<i>Flavipedes</i>	<i>A. micronesiensis</i>	CBS 138183	KJ775548	KJ775085	KJ775355	KP987023
<i>Flavipedes</i>	<i>A. movilensis</i>	CBS 134395	HG915904	HG916697	HG916740	HG916718
<i>Flavipedes</i>	<i>A. neoflavipes</i>	CBS 260.73	EF669614	EU014084	EF669572	EF669656
<i>Flavipedes</i>	<i>A. polyporicola</i>	NRRL 32683	EF669595	EU014088	EF669553	EF669637
<i>Flavipedes</i>	<i>A. spelaeus</i>	CBS 134371	HG915905	HG916698	HG916741	HG916719
<i>Flavipedes</i>	<i>A. templicola</i>	CBS 138181	KJ775545	KJ775092	KJ775394	KP987017
<i>Flavipedes</i>	<i>A. urmiensis</i>	CBS 139558	KP987073	KP987041	KP987056	KP987030
<i>Fumigati</i>	<i>A. assulatus</i>	KACC 41691	HF545007			HF545311
<i>Fumigati</i>	<i>A. auratus</i>	CBS 466.65	EF669979	EF669835	EF669905	EF669766
<i>Fumigati</i>	<i>A. aureolus</i>	CBS 105.55	EF669950	EF669808	EF669877	EF669738
<i>Fumigati</i>	<i>A. australiensis</i>	CBS 112.55	EF669953	EF669811	EF669880	EF669741
<i>Fumigati</i>	<i>A. brevipes</i>	CBS 118.53	EF669954	EF669812	EF669881	EF669742
<i>Fumigati</i>	<i>A. brevistipitatus</i>	CBS 135454	HF937386	HF933364	HF933388	HF937380
<i>Fumigati</i>	<i>A. caatingaensis</i>	IFM 61335		AB743854	AB743860	LT158500
<i>Fumigati</i>	<i>A. conversis</i>	CBS 135457	HF937385	HF933363	HF933387	HF937379
<i>Fumigati</i>	<i>A. delicatus</i>	CBS 101754		DQ114124	DQ114132	
<i>Fumigati</i>	<i>A. denticulatus</i>	CBS 652.73		DQ114125	DQ114133	
<i>Fumigati</i>	<i>A. duricaulis</i>	CBS 481.65	EF669971	EF669827	EF669897	EF669758
<i>Fumigati</i>	<i>A. felis</i>	CBS 130245	JX021685	JX021700	JX021715	
<i>Fumigati</i>	<i>A. fennelliae</i>	CBS 598.74	EF669994	AF057320	EF669920	EF669781
<i>Fumigati</i>	<i>A. fischeri</i>	CBS 544.65	EF669936	EF669796	EF669865	EF669724
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatiaffinis</i>	CBS 117186		DQ094885	DQ094891	
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumigatus</i>	CBS 133.61	EF669931	EF669791	EF669860	EF669719
<i>Fumigati</i>	<i>A. fumisynnematus</i>	IFM 42277	AB250779	AB248076	AB259968	
<i>Fumigati</i>	<i>A. galapagensis</i>	CBS 117522		DQ534145	DQ534151	
<i>Fumigati</i>	<i>A. hiratsukae</i>	CBS 294.93	JN943579		AY870699	
<i>Fumigati</i>	<i>A. huiyaniae</i>	IFM 57847		AB787219	AB787564	
<i>Fumigati</i>	<i>A. lacinosus</i>	CBS 117721	AB299413	AY870756	AY870716	
<i>Fumigati</i>	<i>A. lentulus</i>	CBS 117885	EF669969	EF669825	EF669895	EF669756
<i>Fumigati</i>	<i>A. marvonovae</i>	NRRL 62486	HE974450	HE974387	HE974389	HE974396
<i>Fumigati</i>	<i>A. multiplicatus</i>	CBS 646.95	HE974445	DQ114129	DQ114137	HE974397
<i>Fumigati</i>	<i>A. neoglaber</i>	CBS 111.55	EF669948	EU014107	EU014120	EF669736
<i>Fumigati</i>	<i>A. nishimurae</i>	CBS 117265	HE974451	DQ534154	HE974392	HE974395
<i>Fumigati</i>	<i>A. novofumigatus</i>	CBS 117520		DQ094886	DQ094893	
<i>Fumigati</i>	<i>A. oerlinghausenensis</i>	CBS 139183	KT359601	KT359603	KT359605	
<i>Fumigati</i>	<i>A. papuensis</i>	CBS 841.96	EU220280	AY870738	AY870697	
<i>Fumigati</i>	<i>A. pernambucoensis</i>	IFM 61342		AB743856	AB743862	
<i>Fumigati</i>	<i>A. quadricinctus</i>	CBS 135.52	EF669947	EF669806	EF669875	EF669735
<i>Fumigati</i>	<i>A. shendawei</i>	IFM 57611		AB488754	AB488762	
<i>Fumigati</i>	<i>A. siamensis</i>	IFM 59793		AB646989	AB776704	

<i>Fumigati</i>	<i>A. solicola</i>	NRRL 35723	EU220279	EU220283	EU220284	
<i>Fumigati</i>	<i>A. spathulatus</i>	NRRL 20549	EF669943	EF669803	EF669872	EF669731
<i>Fumigati</i>	<i>A. spinosus</i>	CBS 483.65	EF669988	EF669844	EF669914	EF669775
<i>Fumigati</i>	<i>A. stramenius</i>	CBS 498.65	EF669984	EF669840	EF669910	EF669771
<i>Fumigati</i>	<i>A. sublevisporus</i>	CBS 128796		AB488759	AB488767	
<i>Fumigati</i>	<i>A. takakii</i>	CBM FA-884		AB787221	AB787566	
<i>Fumigati</i>	<i>A. thermomutatus</i>	CBS 208.92	EF669946	EF669805	EF669874	EF669734
<i>Fumigati</i>	<i>A. tsunodae</i>	CBM FA-0950	HE974447	AB488755	AB488763	HE974400
<i>Fumigati</i>	<i>A. tsurutae</i>	CBM FA-933		AB488760	AB488768	
<i>Fumigati</i>	<i>A. turcosus</i>	KACC 42091		DQ534143	DQ534148	HF545310
<i>Fumigati</i>	<i>A. udagawae</i>	CBS 114217	AB250781	AF132226	AB748566	
<i>Fumigati</i>	<i>A. unilateralis</i>	CBS 126.56	EF669997	EF669852	EF669923	EF669784
<i>Fumigati</i>	<i>A. viridinutans</i>	CBS 127.56	EF669978	AF134779	DQ534162	EF669765
<i>Fumigati</i>	<i>A. waksmanii</i>	NRRL 179	EF669934	EF669794	EF669863	EF669722
<i>Fumigati</i>	<i>A. wyomingensis</i>	CCF 4417	HG324081	HF933359	HF933397	HF937378
<i>Fumigati</i>	<i>A. arcoverdensis</i>	CBS 139187	KY808748	AB818845	AB818856	KY808940
<i>Fumigati</i>	<i>A. frankstonensis</i>	CBS 142233	KY808756	KY808594	KY808724	KY808948
<i>Fumigati</i>	<i>A. pseudoviridinutans</i>	CBS 140396		GQ144441	GQ144442	KJ914730
<i>Fumigati</i>	<i>A. tasmanicus</i>	CBS 283.66	AB185279	AY685180	AY689367	LN874010
<i>Nidulantes</i>	<i>A. amoenus</i>	NRRL 4838	EF652480	JN853946	JN854035	JN853824
<i>Nidulantes</i>	<i>A. angustatus</i>	CBS 273.65	EU448283	AY339993	EU443984	KU867013
<i>Nidulantes</i>	<i>A. askiburgiensis</i>	CBS 134374	LN873939	LN873952	LN873965	LN873984
<i>Nidulantes</i>	<i>A. asperescens</i>	CBS 110.51	EF652475	EF652299	EF652387	EF652211
<i>Nidulantes</i>	<i>A. astellatus</i>	CBS 134.55	EF652446	EF652270	EF652358	EF652182
<i>Nidulantes</i>	<i>A. aurantiobrunneus</i>	CBS 465.65	EF652465	EF652289	EF652377	EF652201
<i>Nidulantes</i>	<i>A. aurantiopurpureus</i>	CBS 140608	KU866588	KU866824	KU866711	KU866966
<i>Nidulantes</i>	<i>A. aureolatus</i>	CBS 190.65	EF652501	EF652325	EF652413	EF652237
<i>Nidulantes</i>	<i>A. austroafricanus</i>	NRRL 233	JQ301891	JN853963	JN854025	JN853814
<i>Nidulantes</i>	<i>A. bostwanensis</i>	CBS 314.89	KU866572	KU866812	KU866695	KU866949
<i>Nidulantes</i>	<i>A. caespitosus</i>	CBS 103.45	EF652428	EF652252	EF652340	EF652164
<i>Nidulantes</i>	<i>A. corrugatus</i>	CBS 191.77	KU866574	KU866814	AB476811	KU866951
<i>Nidulantes</i>	<i>A. creber</i>	NRRL 58592	JQ301889	JN853980	JN854043	JN853832
<i>Nidulantes</i>	<i>A. croceus</i>	CBS 134396	LN873931	LN873944	LN873957	LN873976
<i>Nidulantes</i>	<i>A. cvjetkovicii</i>	NRRL 227	EF652440	EF652264	EF652352	EF652176
<i>Nidulantes</i>	<i>A. desertorum</i>	CBS 653.73	EF652505	EF652329	EF652417	EF652241
<i>Nidulantes</i>	<i>A. dromiae</i>	CBS 140633	KU866580	KU866885	KU866703	KU866958
<i>Nidulantes</i>	<i>A. falconensis</i>	CBS 271.91	KU866575	KU866815	KU866697	KU866952
<i>Nidulantes</i>	<i>A. filifer</i>	CBS 113636	EU448277	EF428372	EU443973	KU866932
<i>Nidulantes</i>	<i>A. foveolatus</i>	CBS 279.81	KX423658	KX423622	AB524038	KU867034
<i>Nidulantes</i>	<i>A. fructiculosus</i>	CBS 486.65	EF652483	EF652307	EF652395	EF652219
<i>Nidulantes</i>	<i>A. fructus</i>	NRRL 239	EF652449	EF652273	EF652361	EF652185
<i>Nidulantes</i>	<i>A. griseoaurantiacus</i>	CBS 138191	KJ775553	KJ775086	KJ775357	KU866988
<i>Nidulantes</i>	<i>A. hongkongensis</i>	NBRC 110693	AB987907	LC000552	LC000565	LC000578
<i>Nidulantes</i>	<i>A. israelensis</i>	CBS 140627	KU866677	KU866915	KU866797	KU867062
<i>Nidulantes</i>	<i>A. jaipurensis</i>	CBS 952.97	KU866623	AY339988	KU866761	KU867024
<i>Nidulantes</i>	<i>A. jensenii</i>	NRRL 58600	JQ301892	JN854007	JN854046	JN853835

<i>Nidulantes</i>	<i>A. latilabiatus</i>	CBS 426.93	KU866624	KU866864	KU866762	KU867025
<i>Nidulantes</i>	<i>A. latus</i>	CBS 492.65	KF465768	AB248334	KU866693	KU866946
<i>Nidulantes</i>	<i>A. miraensis</i>	CGMCC3.14984	KU866642	KC342577	KU866780	KU867045
<i>Nidulantes</i>	<i>A. multicolor</i>	CBS 133.54	EF652477	EF652301	EF652389	EF652213
<i>Nidulantes</i>	<i>A. mulundensis</i>	DSMZ 5745	KP985732	KP985735	KP985734	KU866989
<i>Nidulantes</i>	<i>A. navahoensis</i>	CBS 351.81	EF652424	EF652248	EF652336	EF652160
<i>Nidulantes</i>	<i>A. nidulans</i>	CBS 589.65	EF652427	EF652251	EF652339	EF652163
<i>Nidulantes</i>	<i>A. olivicola</i>	CBS 119.37	EU448268	AY339996	EU443986	KU866923
<i>Nidulantes</i>	<i>A. omanensis</i>	CBM FA-700		AB524047	AB524047	
<i>Nidulantes</i>	<i>A. pachycristatus</i>	IFM 55265		AB375875	AB524062	
<i>Nidulantes</i>	<i>A. pluriseminatus</i>	CBS 100523	KU866566	AY339989	EU443988	KU866937
<i>Nidulantes</i>	<i>A. protuberus</i>	CBS 602.74	EF652460	EF652284	EF652372	EF652196
<i>Nidulantes</i>	<i>A. purpureus</i>	CBS 754.74	EF652506	EF652330	EF652418	EF652242
<i>Nidulantes</i>	<i>A. puulaauensis</i>	NRRL 35641	JQ301893	JN853979	JN854034	JN853823
<i>Nidulantes</i>	<i>A. qinqixiani</i>	CBS 128788	KU866600	AB524360	AB524051	KU866980
<i>Nidulantes</i>	<i>A. quadrillineatus</i>	CBS 591.65	EF652433	EF652257	EF652345	EF652169
<i>Nidulantes</i>	<i>A. recurvatus</i>	CBS 496.65	EF652482	EF652306	EF652394	EF652218
<i>Nidulantes</i>	<i>A. rugulosus</i>	CBS 133.60	EF652434	EF652258	EF652346	EF652170
<i>Nidulantes</i>	<i>A. savannensis</i>	CBS 140607	KU866581	KU866818	KU866704	KU866959
<i>Nidulantes</i>	<i>A. spelunceus</i>	CBS 497.65	EF652490	EF652314	EF652402	EF652226
<i>Nidulantes</i>	<i>A. spinulosporus</i>	CBS 120.55	EF652445	EF652269	EF652357	EF652181
<i>Nidulantes</i>	<i>A. stella-maris</i>	CBS 113638	EU448269	KU866886	EU443978	KU866925
<i>Nidulantes</i>	<i>A. stellatus</i>	CBS 598.65	EF652426	EF652250	EF652338	EF652162
<i>Nidulantes</i>	<i>A. stercorarius</i>	CBS 428.93	KU866625	KU866865	KU866763	KU867026
<i>Nidulantes</i>	<i>A. striatus</i>	CBS 283.67	EF652470	EF652294	EF652382	EF652206
<i>Nidulantes</i>	<i>A. subversicolor</i>	NRRL 58999	JQ301894	JN853970	JN854010	JN853799
<i>Nidulantes</i>	<i>A. sulphureoviridis</i>	CBS 140626	KU866673	KU866911	KU866793	KU867058
<i>Nidulantes</i>	<i>A. sydowii</i>	CBS 593.65	EF652450	EF652274	EF652362	EF652186
<i>Nidulantes</i>	<i>A. tabacinus</i>	CBS 122718	EF652478	EF652302	EF652390	EF652214
<i>Nidulantes</i>	<i>A. tennesseensis</i>	NRRL 13150	JQ301895	JN853976	JN854017	JN853806
<i>Nidulantes</i>	<i>A. undulatus</i>	CBS 261.88	EU448275	EF428363	EU443989	KU866928
<i>Nidulantes</i>	<i>A. unguis</i>	CBS 132.55	EF652443	EF652267	EF652355	EF652179
<i>Nidulantes</i>	<i>A. varians</i>	CBS 505.65	EF652479	EF652303	EF652391	EF652215
<i>Nidulantes</i>	<i>A. venenatus</i>	NRRL 13147	JQ301896	JN854003	JN854014	JN853803
<i>Nidulantes</i>	<i>A. venezuelensis</i>	CBS 868.97	AJ874119	AY339998	EU443977	KU866931
<i>Nidulantes</i>	<i>A. versicolor</i>	CBS 538.65	EF652442	EF652266	EF652354	EF652178
<i>Nidulantes</i>	<i>A. violaceus</i>	CBS 138.55	EF652438	EF652262	EF652350	EF652174
<i>Nidulantes</i>	<i>A. viridicatenatus</i>	CBS 140629	KU866682	KX423621	KU866802	KU867067
<i>Nidulantes</i>	<i>A. pepii</i>	CBS142028	KU613368	KU613371	KU613365	
<i>Nigri</i>	<i>A. aculeatinus</i>	CBS 121060	EU159211	EU159220	EU159241	HF559233
<i>Nigri</i>	<i>A. aculeatus</i>	CBS 172.66	EF661221	HE577806	EF661148	EF661046
<i>Nigri</i>	<i>A. brasiliensis</i>	CBS 101740	FJ629321	FJ629272	FN594543	EF661063
<i>Nigri</i>	<i>A. brunneoviolaceus</i>	CBS 621.78	AJ280003	EF661105	EF661147	EF661045
<i>Nigri</i>	<i>A. carbonarius</i>	CBS 556.65	EF661204	EF661099	EF661167	EF661068
<i>Nigri</i>	<i>A. costaricensis</i>	CBS 115574	DQ900602	FJ629277	FN594545	HE984361
<i>Nigri</i>	<i>A. ellipticus</i>	CBS 707.79	EF661194	HQ632676	EF661170	EF661051

<i>Nigri</i>	<i>A. eucalypticola</i>	CBS 122712	EU482439	EU482435	EU482433	
<i>Nigri</i>	<i>A. floridensis</i>	NRRL 62478		HE984412	HE984429	HE984376
<i>Nigri</i>	<i>A. heteromorphus</i>	CBS 117.55	EU821305	EF661103	EF661169	EF661050
<i>Nigri</i>	<i>A. homomorphus</i>	CBS 101889	EF166063	AY820015	FN594549	
<i>Nigri</i>	<i>A. ibericus</i>	NRRL 35644	EF661200	EF661102	EF661163	EF661065
<i>Nigri</i>	<i>A. indologenus</i>	CBS 114.80	AJ280005	AY585539	AM419750	HE984366
<i>Nigri</i>	<i>A. japonicus</i>	CBS 114.51	AJ279985	HE577804	FN594551	
<i>Nigri</i>	<i>A. lacticoffeatus</i>	CBS 101883	DQ900604	AY819998	EU163270	HE984367
<i>Nigri</i>	<i>A. luchuensis</i>	CBS 205.80	JX500081	JX500062	JX500071	
<i>Nigri</i>	<i>A. neoniger</i>	CBS 115656	FJ491682	FJ491691	FJ491700	KC796429
<i>Nigri</i>	<i>A. niger</i>	CBS 554.65	EF661186	EF661089	EF661154	EF661058
<i>Nigri</i>	<i>A. piperis</i>	CBS 112811	EU821316	FJ629303	EU163267	KC796427
<i>Nigri</i>	<i>A. pulverulentus</i>	CBS 558.65	EU821317	HE984408	HE984423	HE984368
<i>Nigri</i>	<i>A. saccharolyticus</i>	CBS 127449	HM853552	HM853553	HM853554	HF559235
<i>Nigri</i>	<i>A. sclerotii-carbonarius</i>	CBS 121057	EU159216	EU159229	EU159235	
<i>Nigri</i>	<i>A. sclerotioniger</i>	CBS 115572	DQ900606	FJ629304	FN594557	HE984369
<i>Nigri</i>	<i>A. trinidadensis</i>	NRRL 62479		HE984420	HE984434	HE984379
<i>Nigri</i>	<i>A. tubingensis</i>	NRRL 4875	EF661193	EF661086	EF661151	EF661055
<i>Nigri</i>	<i>A. uvarum</i>	CBS 121591	AM745757	AM745751	AM745755	HE984370
<i>Nigri</i>	<i>A. vadensis</i>	CBS 113365	AY585549	AY585531	FN594560	HE984371
<i>Nigri</i>	<i>A. welwitschiae</i>	CBS 139.54	FJ629340	FJ629291	KC480196	
Restricti	<i>A. caesiellus</i>	CBS 470.65	EF652044	EF651884	EF652030	EF651981
Restricti	<i>A. conicus</i>	CBS 475.65	EF652039	EF651881	EF652033	EF651975
Restricti	<i>A. gracilis</i>	CBS 539.65	EF652045	EF651883	EF652031	EF651980
Restricti	<i>A. halophilicus</i>	CBS 122.62	EF652088	EF651926	EF652034	EF651982
Restricti	<i>A. penicillioides</i>	CBS 540.65	EF652036	EF651928	EF652024	EF651930
Restricti	<i>A. restrictus</i>	CBS 123.56	EF652042	EF651880	EF652029	EF651978
Restricti	<i>A. viticola</i>	NRRL 5125	EF652046	EF651927	EF652035	EF651973
Restricti	<i>A. pachycaulis</i>	PRM 944432	KY087758	KY117821	KY068308	KY117999
<i>Terrei</i>	<i>A. alabamensis</i>	CBS 125693	KP987071	KP987049	EU147583	KP987018
<i>Terrei</i>	<i>A. allahabadii</i>	CBS 164.63	EF669601	EF669531	EF669559	EF669643
<i>Terrei</i>	<i>A. ambiguus</i>	CBS 117.58	EF669606	EF669534	EF669564	EF669648
<i>Terrei</i>	<i>A. aureoterreus</i>	CBS 503.65	EF669580	EF669524	EF669538	EF669622
<i>Terrei</i>	<i>A. bicephalus</i>	FMR 14918	LT601380	LT601381	LT601382	LT601383
<i>Terrei</i>	<i>A. carneus</i>	CBS 494.65	EF669611	EF669529	EF669569	EF669653
<i>Terrei</i>	<i>A. citrinoterreus</i>	CBS 138921	KP175260	LN680657	LN680685	
<i>Terrei</i>	<i>A. floccosus</i>	CBS 116.37	FJ531205	FJ491714	FJ531219	KP987021
<i>Terrei</i>	<i>A. hortai</i>	CBS 124230	FJ531192	FJ491706	FJ531242	KP987022
<i>Terrei</i>	<i>A. iranicus</i>	CBS 139561	KP987077	KP987045	KP987060	KP987034
<i>Terrei</i>	<i>A. microcysticus</i>	CBS 120.58	EF669607	EF669515	EF669565	EF669649
<i>Terrei</i>	<i>A. neoafricanus</i>	CBS 130.55	AY822633	EF669516	EF669543	EF669627
<i>Terrei</i>	<i>A. neoindicus</i>	CBS 444.75	EF669616	EF669532	EF669574	EF669658
<i>Terrei</i>	<i>A. neoniveus</i>	CBS 261.73	EF669612	EU014098	EF669570	EF669654
<i>Terrei</i>	<i>A. niveus</i>	CBS 115.27	EF669616	EF669528	EF669573	EF669657
<i>Terrei</i>	<i>A. pseudoterreus</i>	CBS 123890	EF669598	EF669523	EF669556	EF669640
<i>Terrei</i>	<i>A. terreus</i>	CBS 601.65	EF669586	EF669519	EF669544	EF669628

<i>Terrei</i>	<i>A. heldtiae</i>	PPRI4229T	MK450656	MK450981	MK451518	MK450809
<i>Terrei</i>	<i>A. Terrei complex</i>	CBS142751	LT798913	LT798948	LT798949	LT798950
<i>Terrei</i>	<i>A. cf alabamensis</i>	CBS142981	LT798912	LT798945	LT798946	LT798947
<i>Terrei</i>	<i>A. cf allahabadii</i>	CBS142987	LT798911	LT798942	LT798943	LT798944
<i>Usti</i>	<i>A. baeticus</i>	NRRL 62501	HE615086	HE615092	HE615117	HE615124
<i>Usti</i>	<i>A. calidoustus</i>	CBS 121601	HE616558	FJ624456	HE616559	
<i>Usti</i>	<i>A. carlsbadensis</i>	CBS 123894	FJ531151	FJ531179	FJ531126	KU866973
<i>Usti</i>	<i>A. contaminans</i>	CBS 14245	LT594451	LT594443	LT594425	LT594434
<i>Usti</i>	<i>A. deflectus</i>	CBS 109.55	EF652437	EF652261	EF652349	EF652173
<i>Usti</i>	<i>A. elongatus</i>	CBS 387.75	EF652502	EF652326	EF652414	EF652238
<i>Usti</i>	<i>A. germanicus</i>	CBS 123887	FJ531146	FJ531172	FJ531141	KU866944
<i>Usti</i>	<i>A. granulosis</i>	NRRL 1932	EF652430	EF652254	EF652342	EF652166
<i>Usti</i>	<i>A. heterothallicus</i>	CBS 488.65	EF652499	EF652323	EF652411	EF652235
<i>Usti</i>	<i>A. insuetus</i>	CBS 107.25	EF652457	EF652281	EF652369	EF652193
<i>Usti</i>	<i>A. keveii</i>	CBS 209.92	EU076354	EU076376	EU076365	KU866938
<i>Usti</i>	<i>A. lucknowensis</i>	CBS 449.75	EF652459	EF652283	EF652371	EF652195
<i>Usti</i>	<i>A. monodii</i>	CBS 435.93	FJ531150	FJ531171	FJ531142	
<i>Usti</i>	<i>A. porphyreostipitatus</i>	CBS 138203	KJ775564	KJ775080	KJ775338	KU866987
<i>Usti</i>	<i>A. pseudodeflectus</i>	CBS 756.74	EF652507	EF652331	EF652419	EF652243
<i>Usti</i>	<i>A. pseudoustus</i>	CBS 123904	FJ531147	FJ531168	FJ531129	KU866978
<i>Usti</i>	<i>A. puniceus</i>	CBS 495.65	EF652498	EF652322	EF652410	EF652234
<i>Usti</i>	<i>A. thesauricus</i>	NRRL 62487	HE615088	HE615095	HE615120	HE615126
<i>Usti</i>	<i>A. turkensis</i>	CBS 504.65	FJ531160	FJ531191	FJ531145	EF652230
<i>Usti</i>	<i>A. ustus</i>	CBS 261.67	EF652455	EF652279	EF652367	EF652191
<i>Usti</i>	<i>A. calidokeveii</i>	CBS 142666	LT798914	LT798951	LT798952	LT798953
<i>Usti</i>	<i>A. keveioides</i>	CBS 132737	JN982704	JN982694	JN982684	KX423660
<i>Usti</i>	<i>A. asper</i>	CBS140842	KT698840	KT698838	KT698839	KT698842
<i>Usti</i>	<i>A. sigurros</i>	PPRI15889	MK450650	MK451066	MK451512	MK450803

Annexe 2 : formulaire détaillé pour la récupération des informations des cas d'aspergillose invasive dus à une espèce cryptique d'*Aspergillus*

Feuille de renseignements aspergilloses invasives à espèces cryptiques

1. Souche envoyée :

Nom de la souche envoyée :

Numéro de prélèvement SIL :

Origine du prélèvement :

Date d'identification MSI 1 :

Espèce identifiée MSI 1 :

Identification moléculaire :

2. Patient :

Âge :

Sexe :

Service :

Pathologie sous-jacente :

Immunodépression (type) :

Nombre de neutrophiles :

Corticoïdes (durée, posologie) :

Autres traitements immunosuppresseurs (durée, posologie) :

3. Aspergillose invasive :

Localisation :

Durée après le début de l'ID :

Résultat des biomarqueurs :

- Galactomananne (sérum, LBA) :
- PCR *Aspergillus* (sérum, LBA, autres sites) :
 - o Cible de la PCR utilisée :

Résultat de l'imagerie :

Traitement :

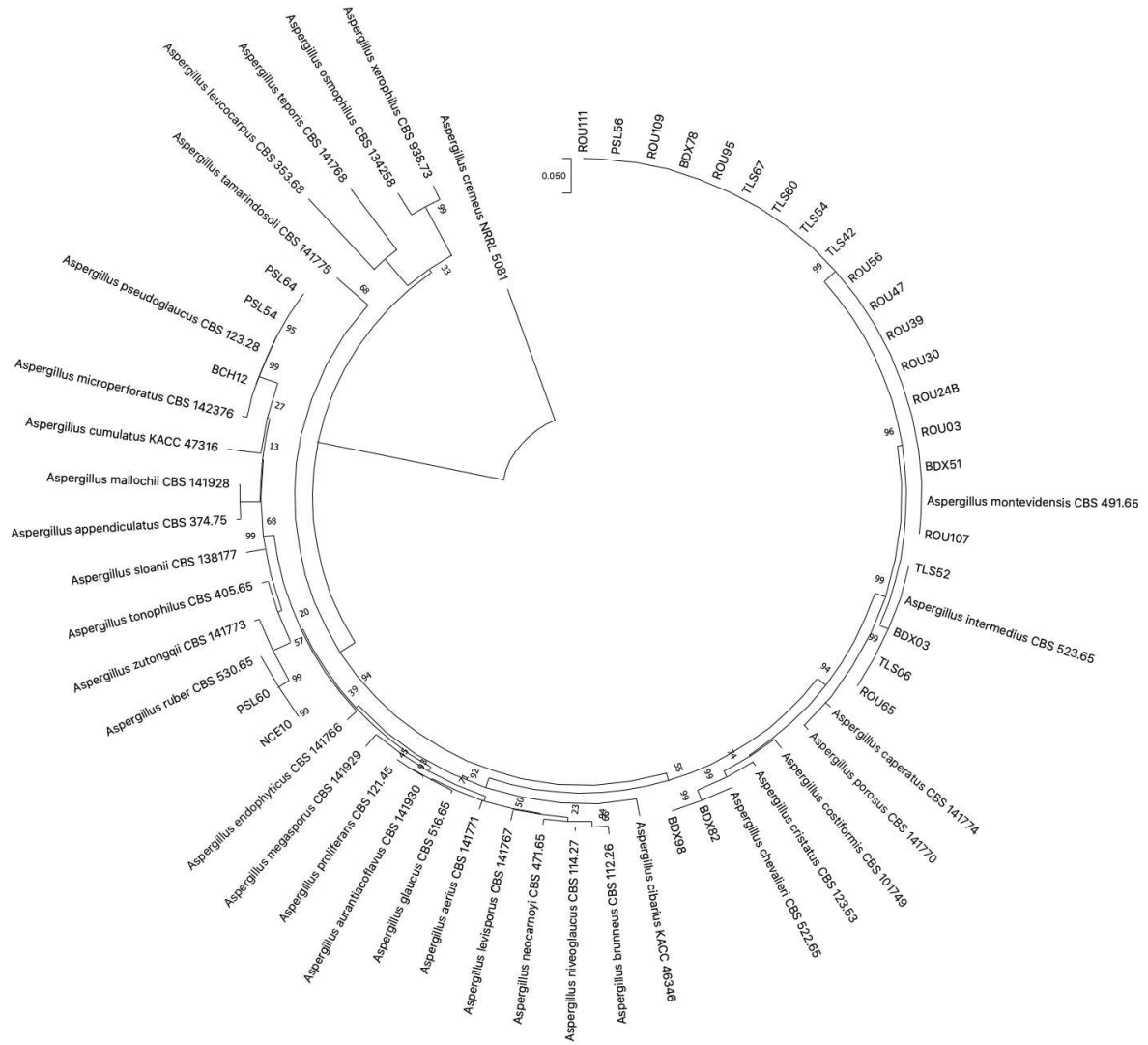
- Avant le diagnostic (molécule, durée, posologie) :
- Après le diagnostic (molécule, durée, posologie) :

Devenir à J30 :

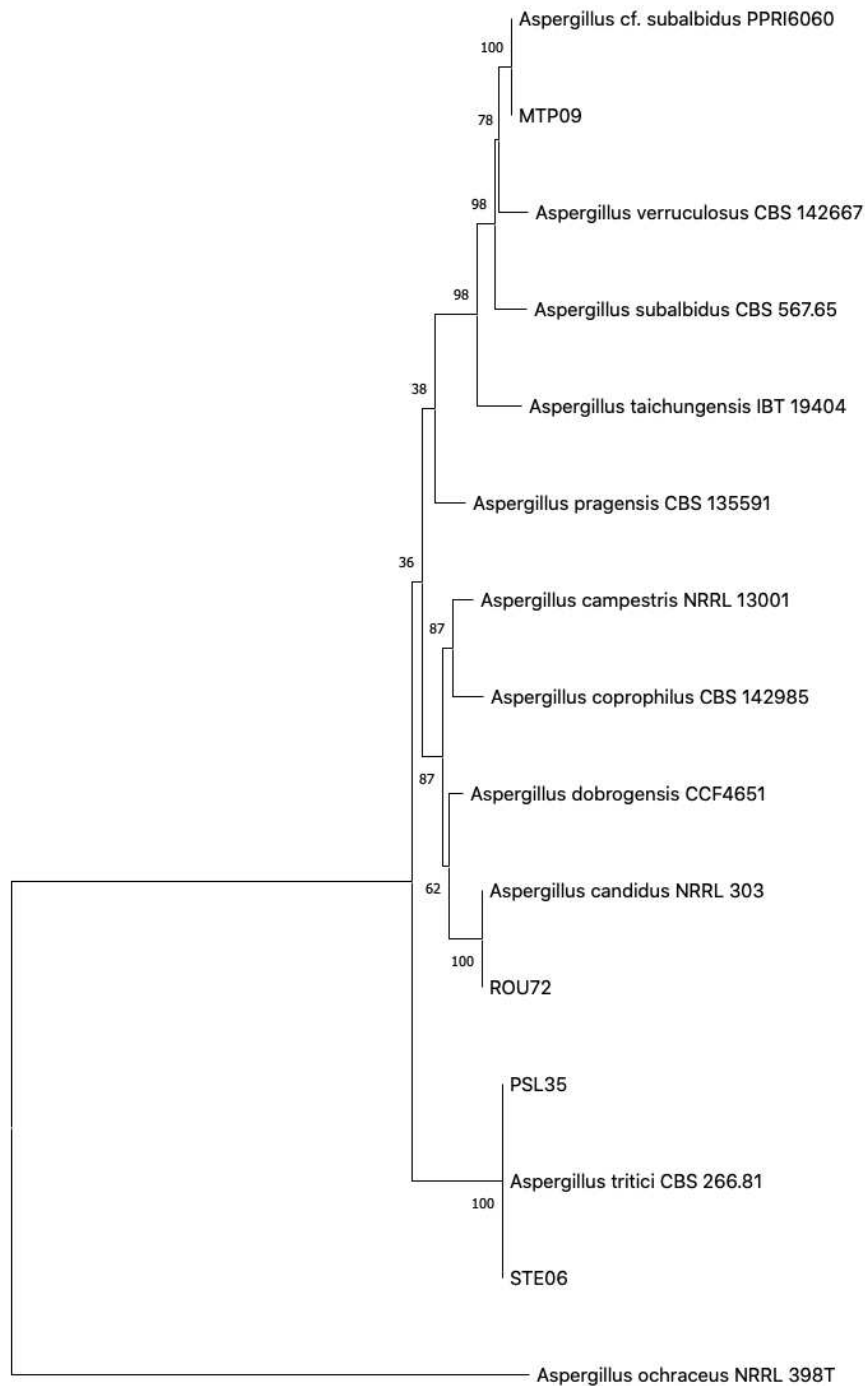
Renseignements AI espèces cryptiques

Français_v1

Annexe 3 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour la section *Aspergillus*. La souche *A. cremeus* NRRL 5081 fait office d'*outgroup*.

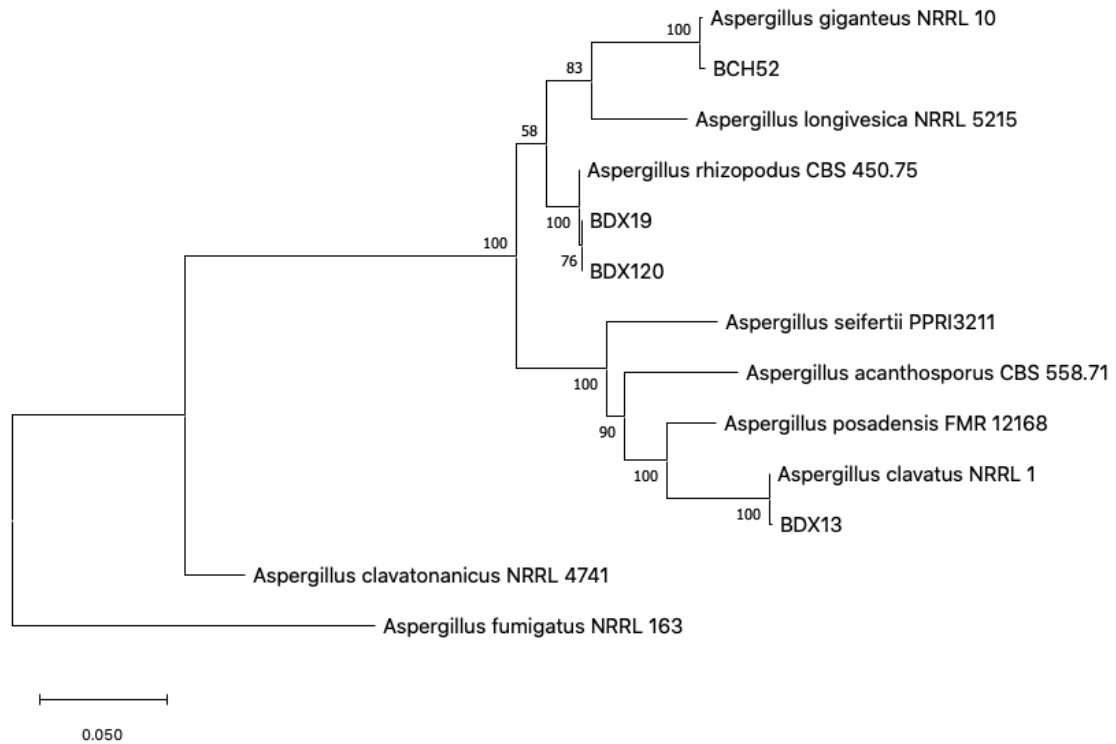


Annexe 4 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour la section *Candidi*. La souche *A. ochraceus* NRRL 398 fait office d'*outgroup*.

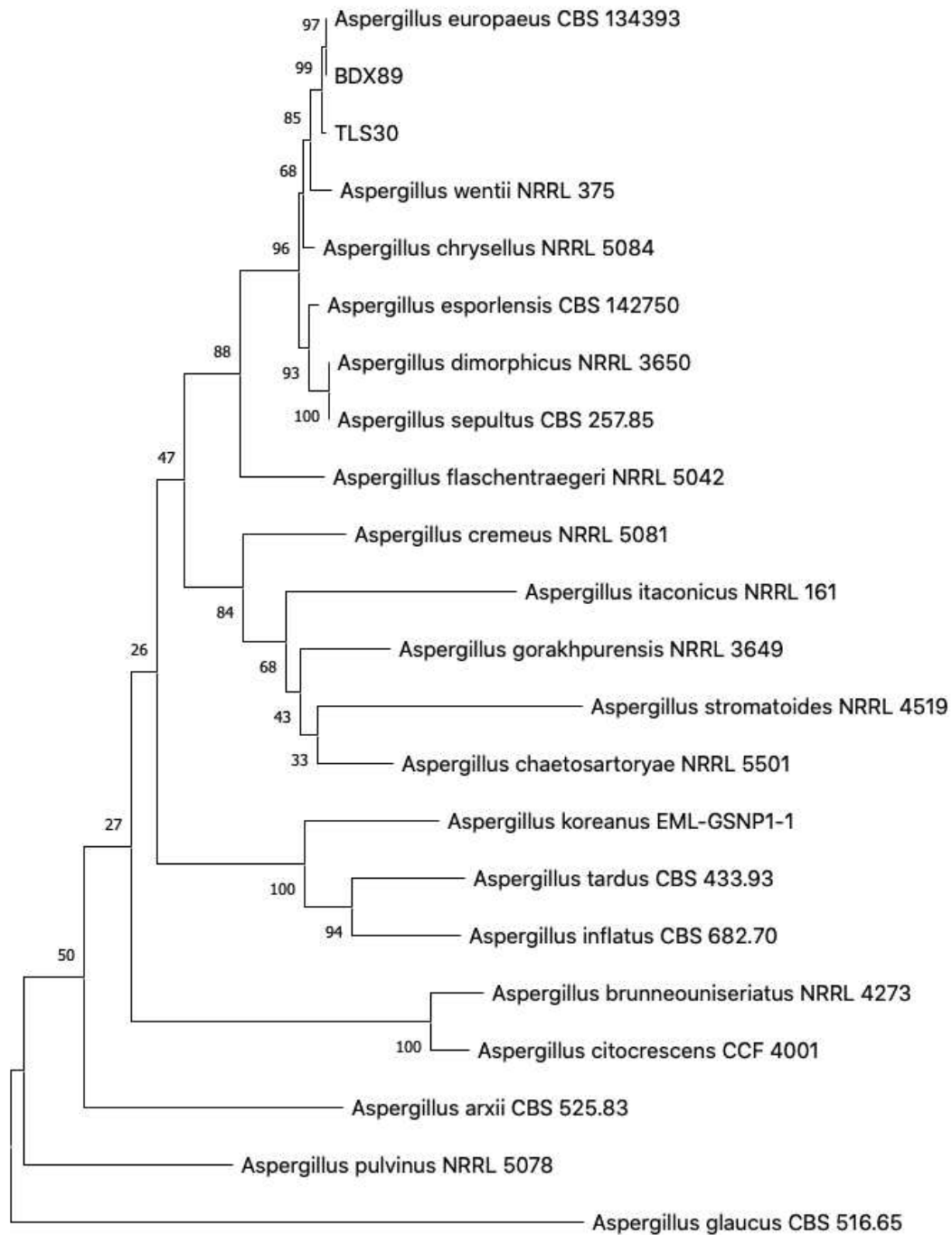


0.050

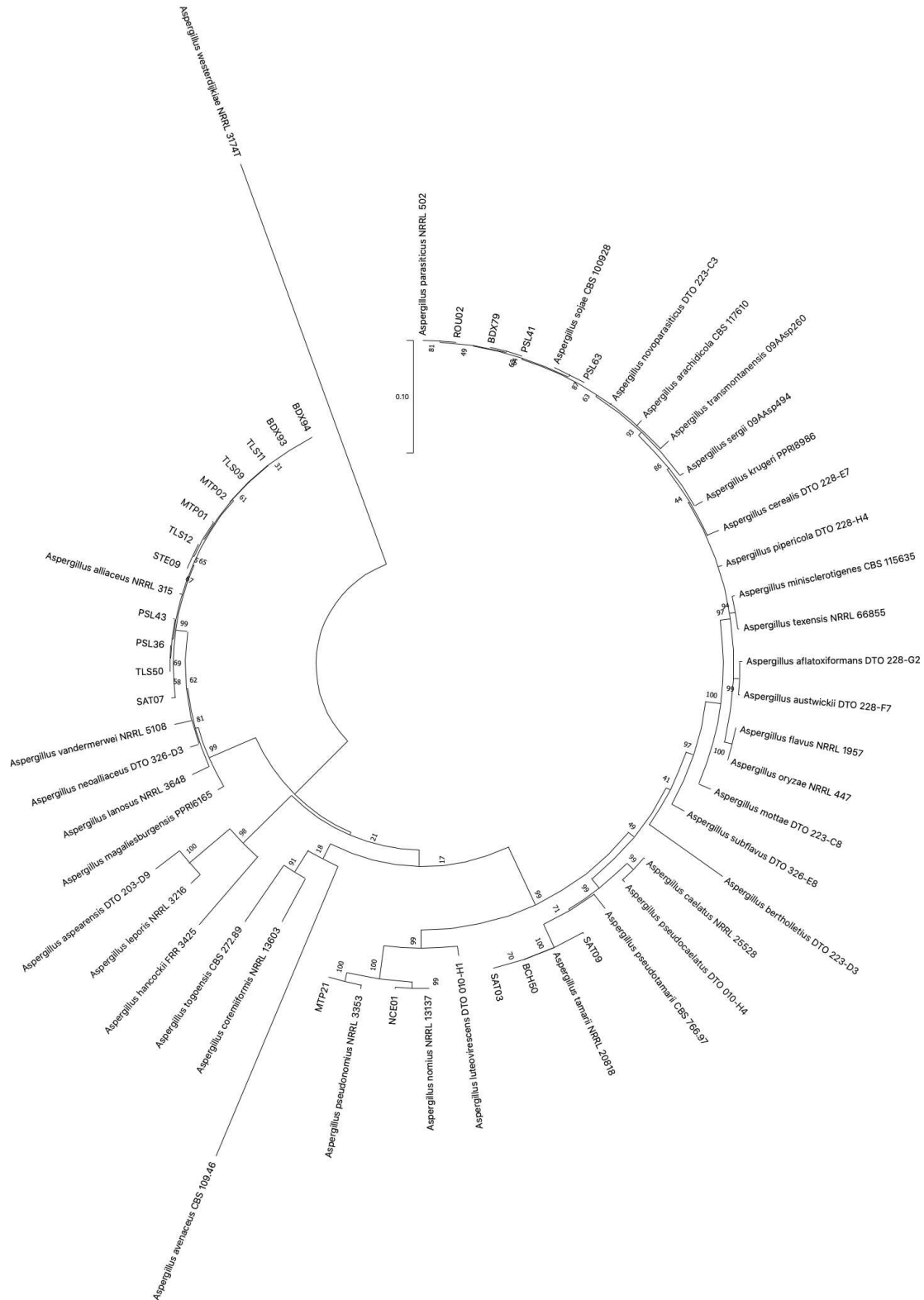
Annexe 6 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour la section *Clavati*. La souche *A. fumigatus* NRRL 163 fait office d'*outgroup*.



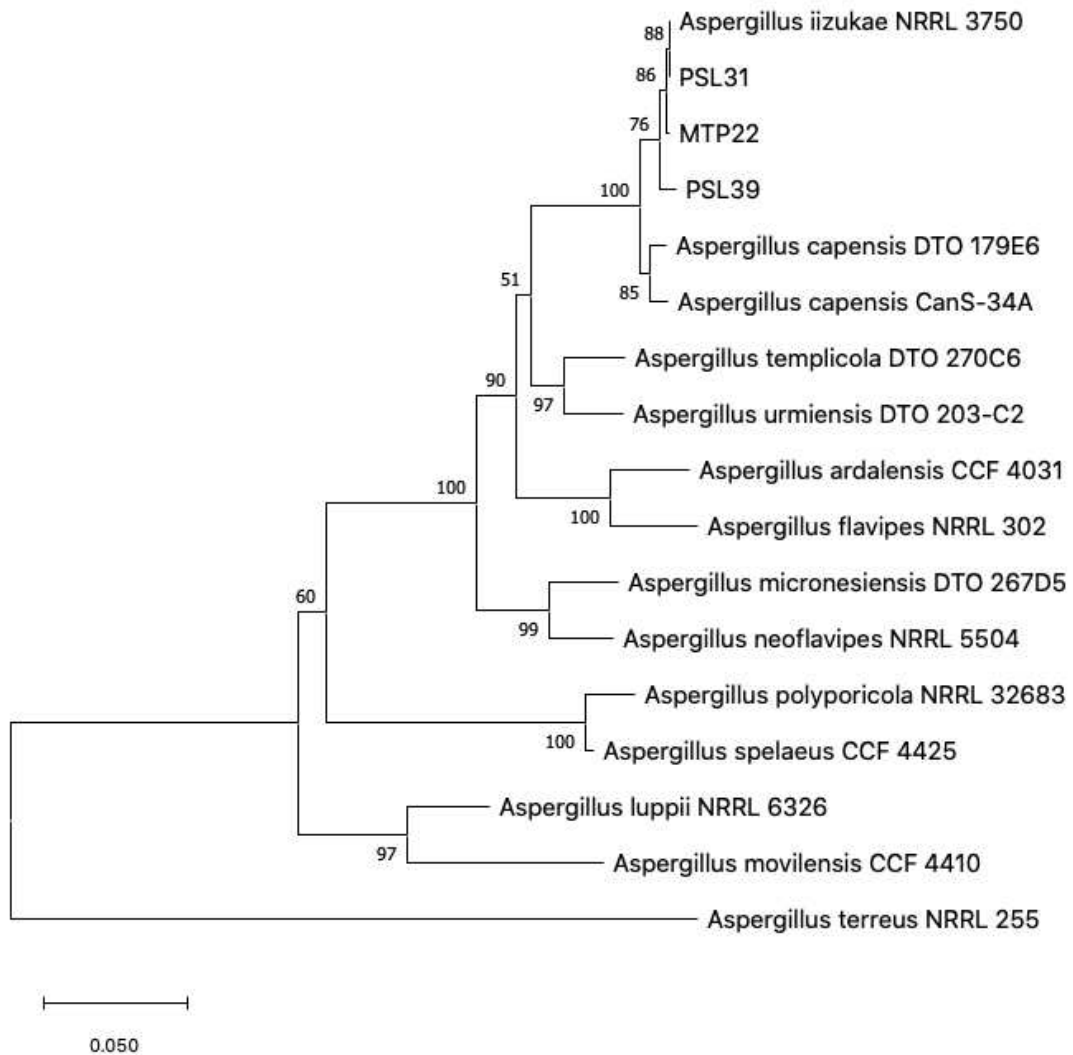
Annexe 7 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour la section *Cremeri*. La souche *A. glaucus* CBS 516.65 fait office d'*outgroup*.



Annexe 8 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour la section *Flavi*. La souche *A. westerdijkiae* NRRL 374 fait office d'*outgroup*.

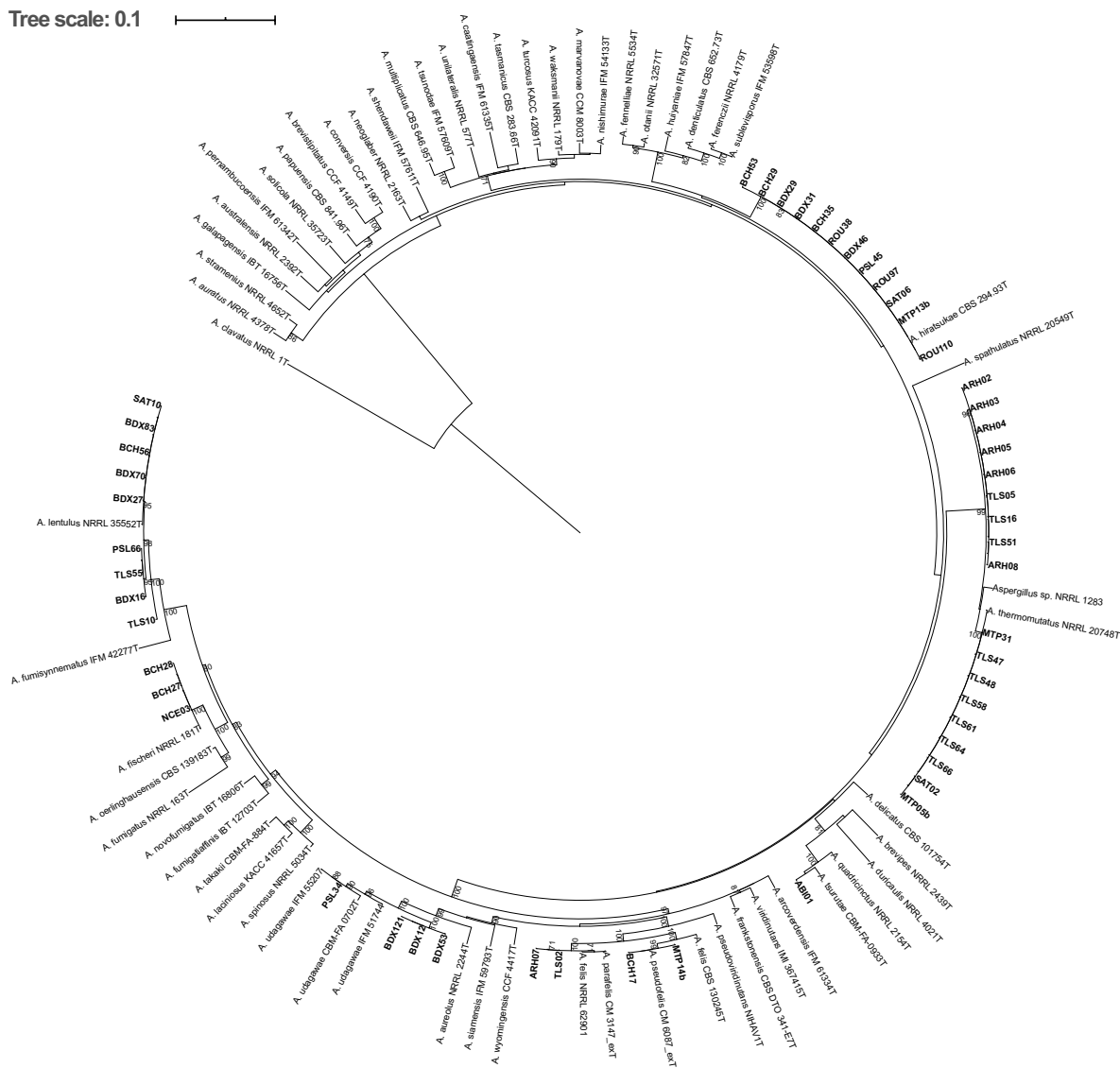


Annexe 9 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour la section *Flavipedes*. La souche *A. terreus* NRRL 255 fait office d'*outgroup*.

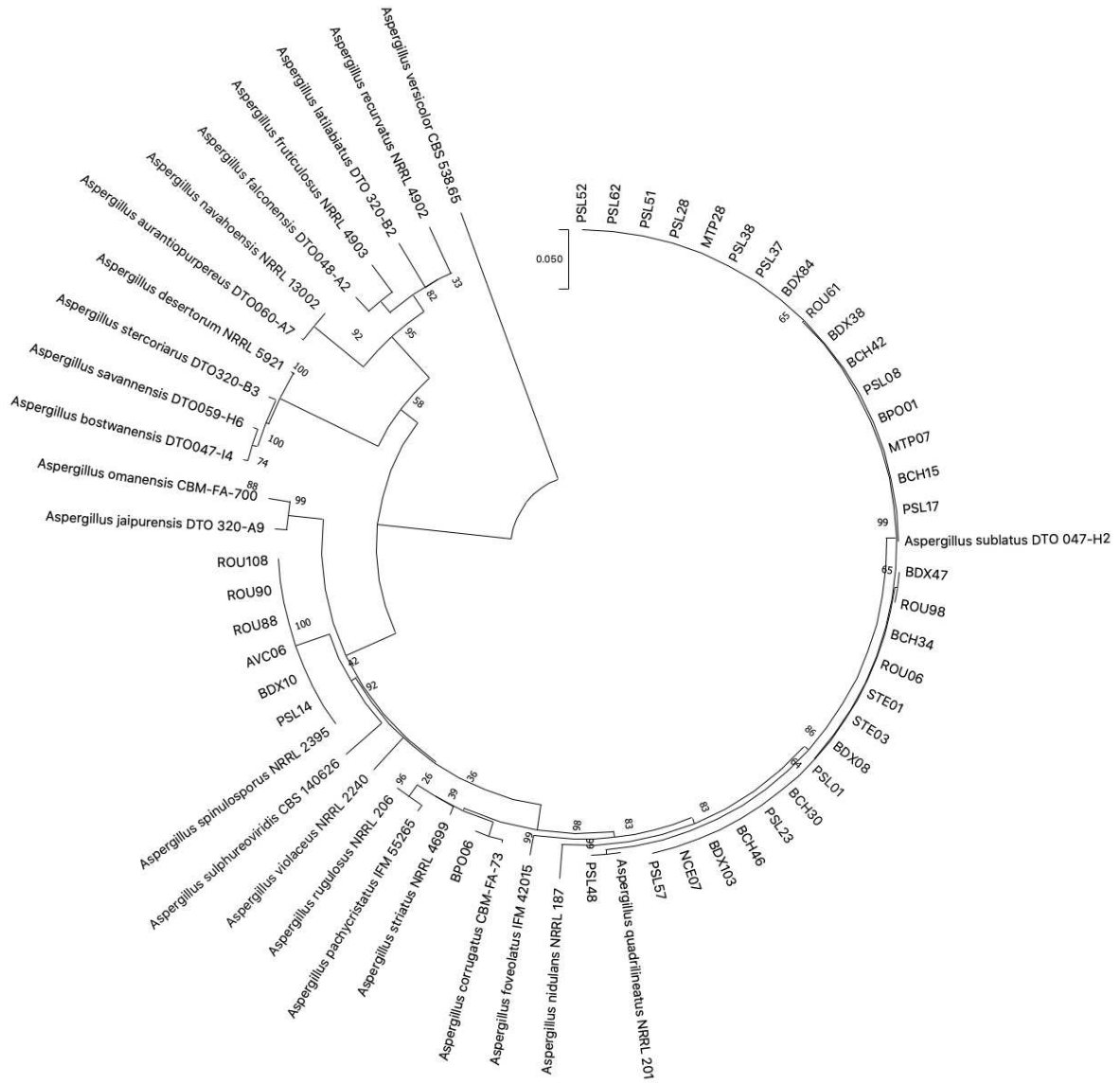


Annexe 10 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour la section *Fumigati*. La souche *A. clavatus* NRRL 1 fait office d'*outgroup*.

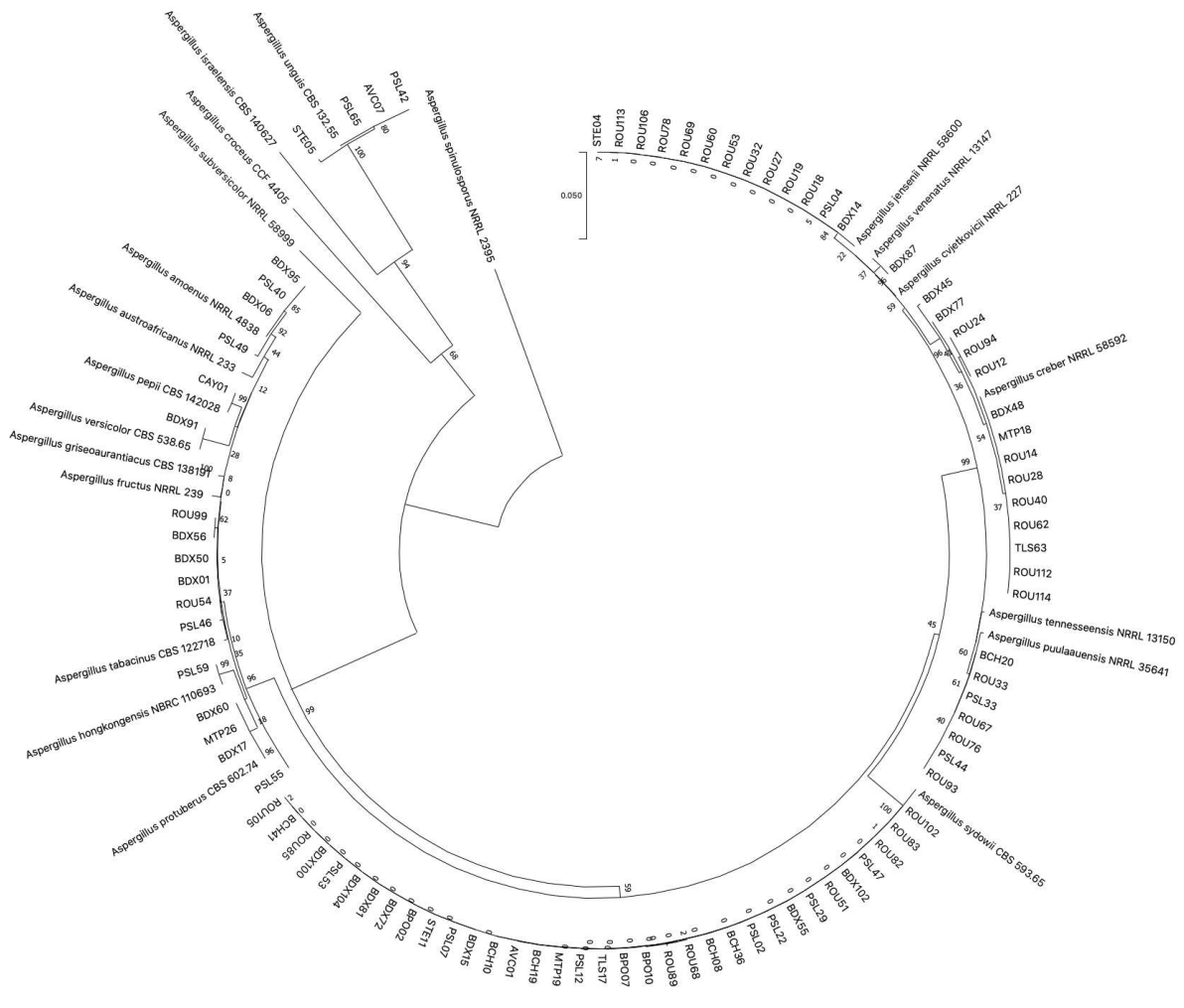
Tree scale: 0.1



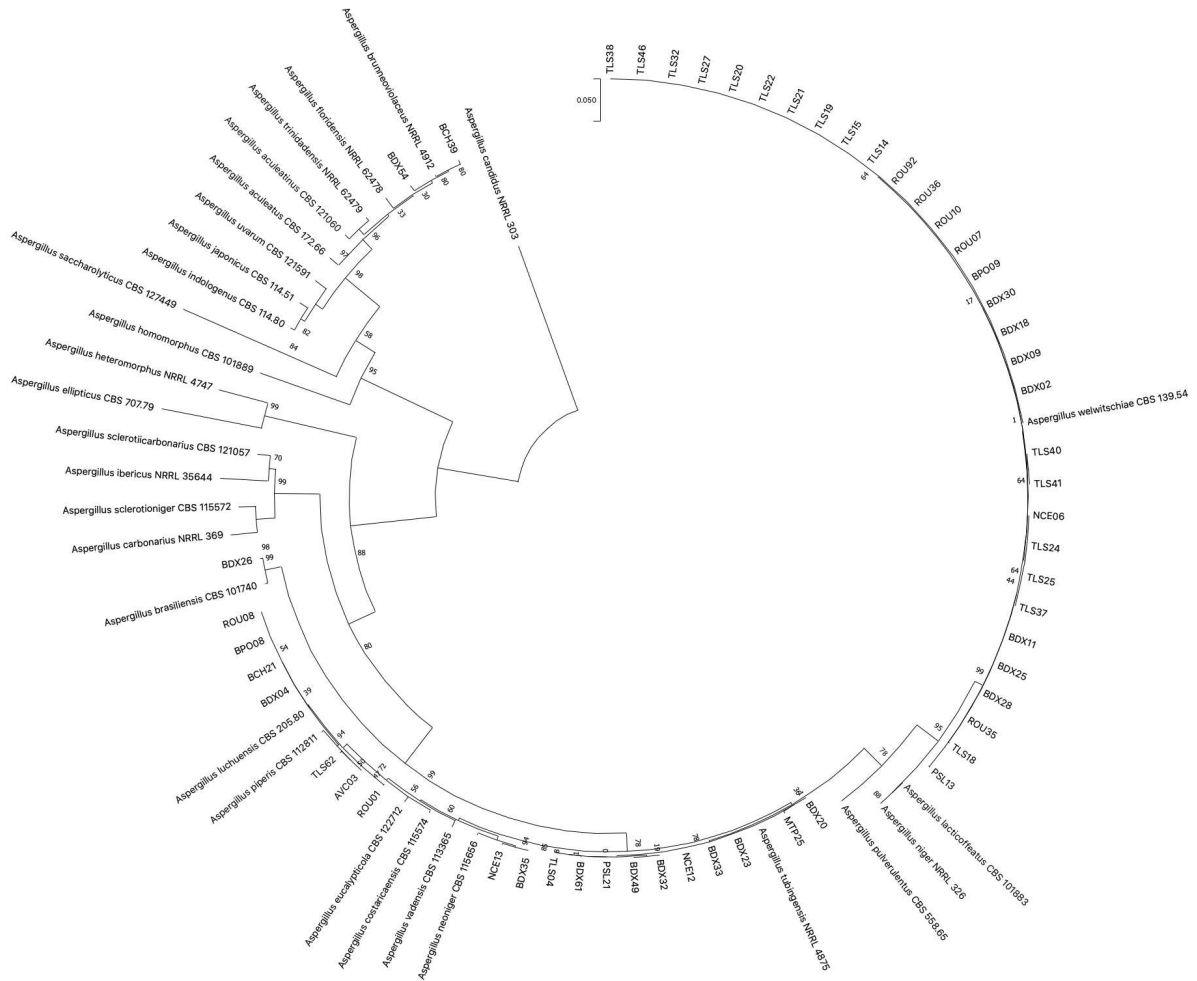
Annexe 11 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences du gène *cmd* pour la série *Nidulantes* au sein de la section *Nidulantes*. La souche *A. versicolor* CBS 538.65 fait office d'outgroup.



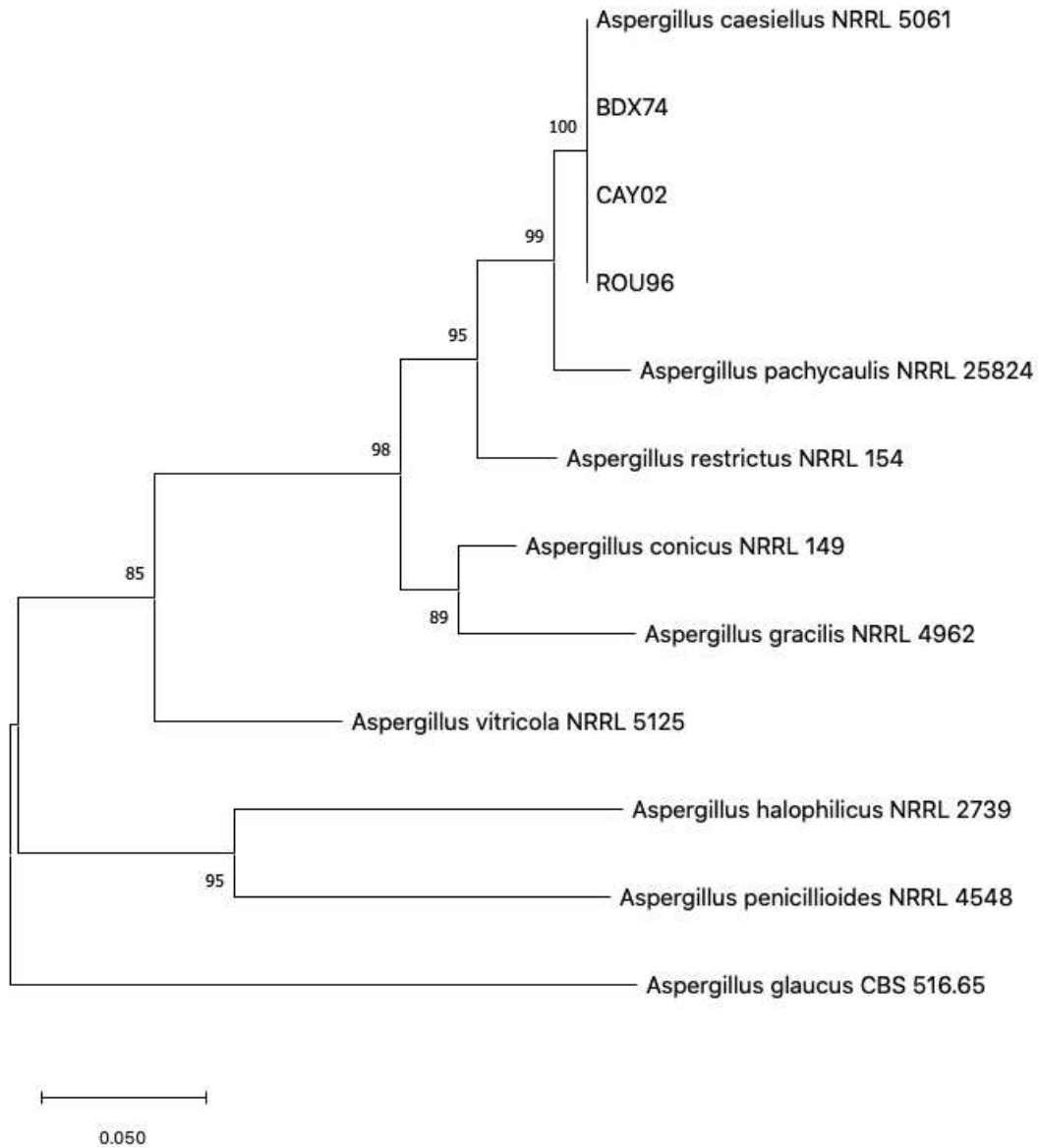
Annexe 12 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour les séries *Versicolores* et *Unguium* au sein de la section *Nidulantes*. La souche *A. spinulosporus* NRRL 2395 fait office d'*outgroup*.



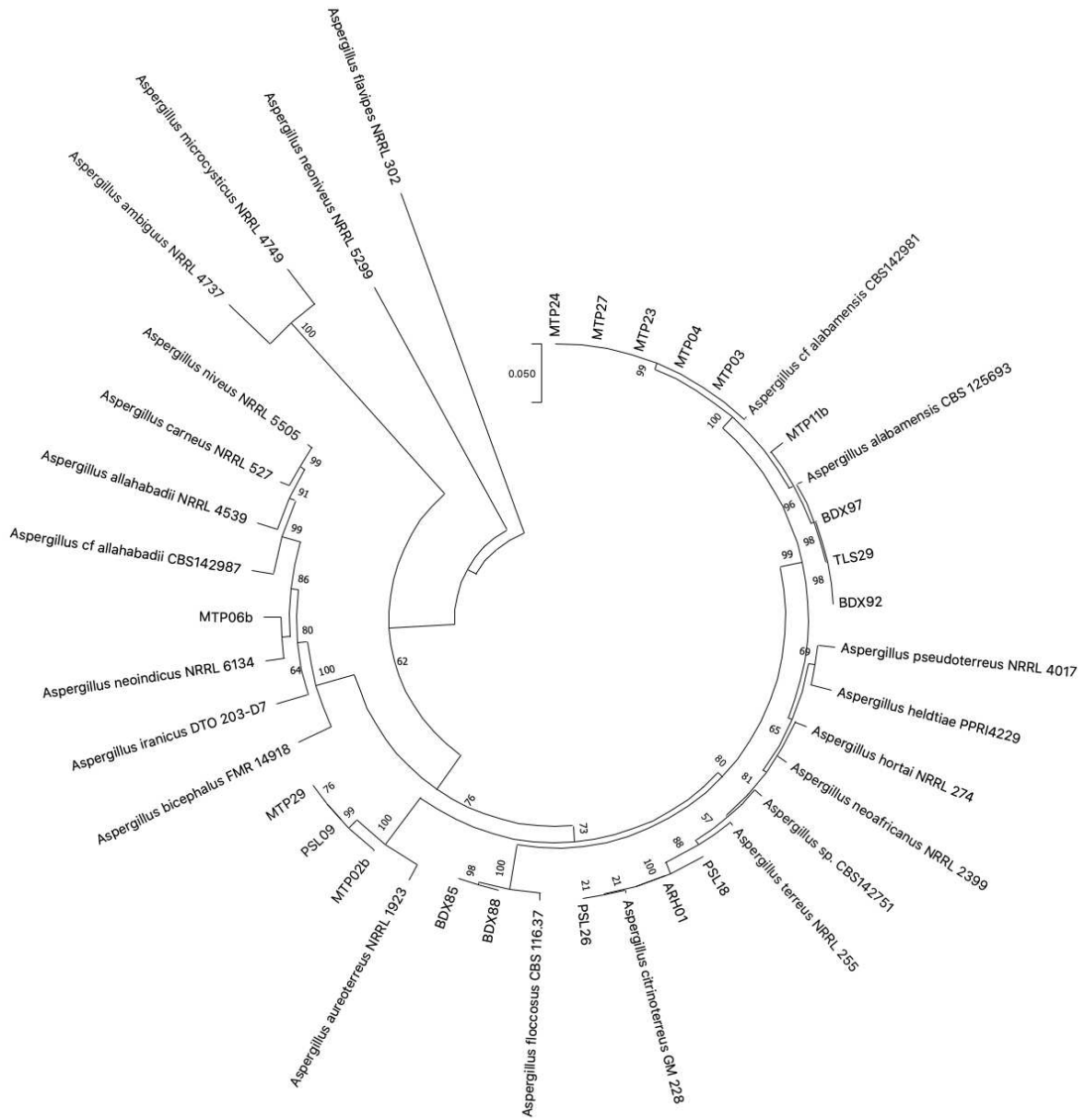
Annexe 13 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour la section *Nigri*. La souche *A. candidus* NRRL 303 fait office d'*outgroup*.



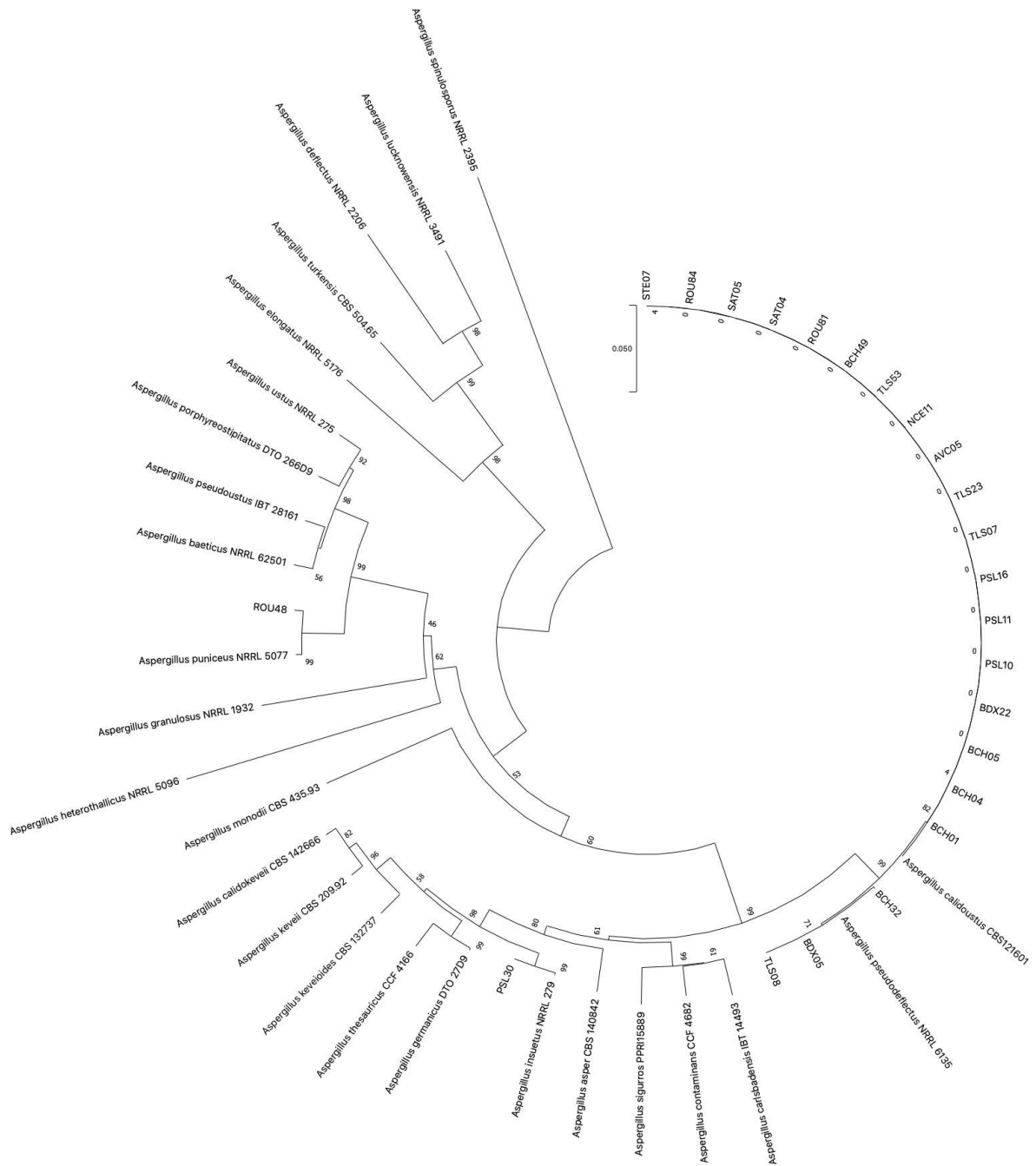
Annexe 14 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour la section *Restricti*. La souche *A. glaucus* CBS 516.65 fait office d'*outgroup*.

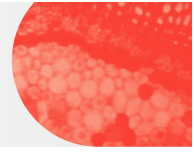


Annexe 15 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour la section *Terrei*. La souche *A. flavipes* NRRL 302 fait office d'*outgroup*.



Annexe 16 : arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance construit avec les séquences concaténées des gènes *benA* et *cmd* pour la section *Usti*. La souche *A. spinulosporus* NRRL 2395 fait office d'*outgroup*.





L'identification des *Aspergillus* en 2020

S. IMBERT^{1,2}, A. FEKKAR^{1,2}

RÉSUMÉ

L'identification des champignons du genre *Aspergillus* au laboratoire, traditionnellement fondée sur leurs caractéristiques morphologiques, a été bouleversée ces dernières années par une modification en profondeur de leur taxonomie. L'introduction du concept d'espèces cryptiques a ainsi considérablement augmenté le nombre d'espèces impliquées en pathologie humaine. Au-delà d'un intérêt épidémiologique, leur identification précise s'est avérée primordiale d'un point de vue clinique, car certaines espèces sont associées à une pathogénicité ou à un profil de résistance aux antifongiques particuliers. Initialement réservée aux laboratoires de référence ayant accès aux outils de séquençage, l'arrivée de la spectrométrie de masse MALDI-TOF, dans les laboratoires de biologie médicale, a démocratisé l'identification précise de ces champignons, au même titre que les autres microorganismes. Cependant, l'exactitude de leur identification dépendra de la qualité de la base de données utilisée, susceptible de varier en fonction des fournisseurs ou du système utilisé.

MOTS-CLÉS : *Aspergillus*, espèces cryptiques, spectrométrie de masse MALDI-TOF, résistance aux antifongiques, infections fongiques

I. - INTRODUCTION

Les *Aspergillus* sont des champignons filamenteux saprophytes dont certaines espèces peuvent être responsables d'infections invasives et/ou superficielles chez l'Homme (1,2). *Aspergillus fumigatus* est considéré comme l'espèce la plus fréquemment impliquée en pathologie humaine, suivie classiquement par *A. flavus*, *A. niger*, *A. nidulans* et *A. terreus*. Cependant, ces dernières années, les modifications de taxonomie ainsi que l'amélioration des outils d'identification ont amené à la description de nouvelles espèces et à leur considération en pathologie humaine (3-5).

L'objectif de cette revue est de faire l'état des connaissances actuelles sur la taxonomie du genre *Aspergillus*, les implications cliniques de ces champignons en pratique courante ainsi que les outils d'identification disponibles.

II. - LE GENRE ASPERGILLUS

Le genre *Aspergillus*, décrit pour la première fois par Micheli en 1729, est l'un des plus anciens noms de genre donné à un champignon (6). Il regroupe un ensemble d'organismes eucaryotes filamenteux (appelés aussi moisissure) ayant comme principale caractéristique microscopique commune l'organisation en « tête aspergillaire » (Figure 1) de leur organe de reproduction asexuée, ou forme anamorphe (7). Située à l'extrémité du conidiophore, cette « tête aspergillaire » est composée d'une vésicule sur laquelle prennent naissance de nombreuses phialides

¹ Groupe Hospitalier Pitié-Salpêtrière, Service de Parasitologie-Mycologie, Paris.

² Centre d'Immunologie et des Maladies Infectieuses (Sorbonne Université-Inserm-CNRS), Paris.

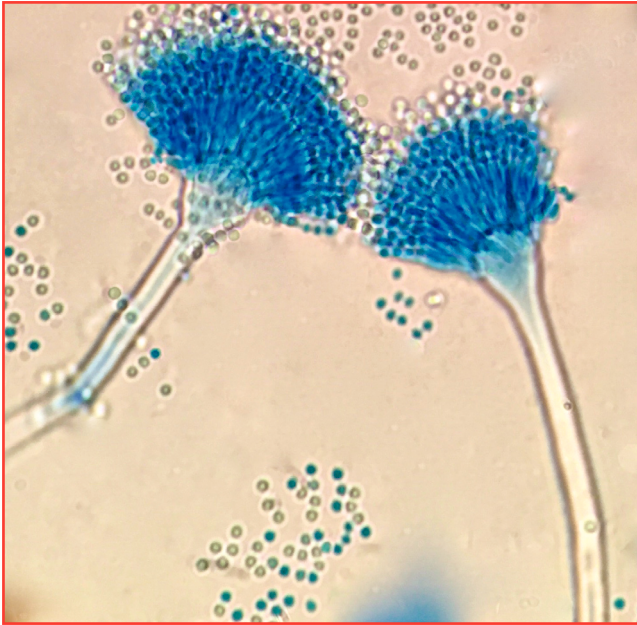


Fig.1 - Têtes aspergillaires de *A. terreus* produisant des conidies.

portant à leur tour de nombreuses spores (ou conidies). Parce que la structure de cette « tête aspergillaire » rappelle l'aspergillum, utilisé par l'Église catholique pour asperger d'eau bénite les croyants, le nom de *Aspergillus* a été donné à ce champignon (7). Certaines espèces présentent également une reproduction sexuée. Elle aboutit à la production d'ascospores regroupées par huit au sein d'un asque, eux-mêmes réunis par milliers au sein d'un cléistothèce (Figure 2). Ce dernier, dont la structure peut varier entre les différentes espèces, correspond à l'organe de reproduction sexuée, ou forme téléomorphe.

Le premier nom d'espèce donné, au sein du genre *Aspergillus* en 1809 par Link, est *A. glaucus* qui correspond donc à l'espèce type (8). De nombreuses autres espèces ont ensuite été décrites, principalement à partir de caractéristiques morphologiques, selon le code de nomenclature botanique. Parmi ces critères, on retrouve les caractères culturels macroscopiques (aspect de la colonie, durée et température de croissance) et les caractéristiques microscopiques dont l'aspect de la « tête aspergillaire ». *A. fumigatus*, une des espèces les plus fréquentes, a ainsi été décrite pour la première fois en 1863 par Fresenius (9).

III. - LA RÉVOLUTION DE LA TAXONOMIE

Cependant, la description des espèces au sein du genre *Aspergillus*, reposant uniquement sur leurs caractéristiques morphologiques, a abouti à plusieurs confusions taxonomiques. Premièrement, les espèces présentant une forme sexuée et une forme asexuée se sont vu attribuer deux noms : l'un pour leur forme anamorphe (*Aspergillus*) et l'autre pour leur forme

téléomorphe. Ainsi, onze noms de genre téléomorphe (*Eurotium*, *Chaetosartorya*, *Emericella*, *Fennellia*, *Hemicarpentales*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Sclerocleista*, *Stillbothamnium*, *Neopetromyces*, *Neocarpentales*) étaient attribués au seul anamorphe *Aspergillus*. En 2000, Pitt décrivait 184 espèces de *Aspergillus* associées à 70 espèces téléomorphes (10). Cependant, au cours des années 2000, les outils de biologie moléculaire ont permis de montrer que les formes anamorphes et téléomorphes de chaque espèce étaient génétiquement identiques. Afin de simplifier la taxonomie et de mettre fin à la double nomenclature, le concept de « one fungus = one name » a été décrété en 2011 (11). Il a donc été décidé de regrouper neuf des onze genres téléomorphes au sein d'un unique genre et de ne garder comme nom de genre commun que le terme *Aspergillus* (3). Les deux genres téléomorphes restants (*Sclerocleista* et *Hemicarpentales*) ne sont désormais plus associés au genre *Aspergillus*.

La seconde confusion taxonomique, liée à l'identification morphologique, a également été mise au jour par l'utilisation des outils de biologie moléculaire. En effet, certains isolats morphologiquement identiques se sont révélés très différents phylogénétiquement, permettant leur séparation en espèces distinctes (12). C'est à partir de ces observations que sont apparus les concepts d'espèces cryptiques et de sections (ou complexes d'espèces). Les espèces cryptiques sont définies comme étant des espèces peu ou pas différenciables morphologiquement de l'espèce princeps, mais distinctes d'un point de vue phylogénétique. Les sections (ou complexes d'espèces), quant à elles, regroupent les espèces cryptiques partageant les mêmes caractéristiques morphologiques (13).

L'introduction des outils de biologie moléculaire a donc révolutionné la taxonomie du genre *Aspergillus*, en redéfinissant la notion d'espèce. En effet, une espèce est désormais caractérisée sur une base polyphasique qui combine des éléments phénotypiques, physiologiques, phylogénétiques et écologiques (3),

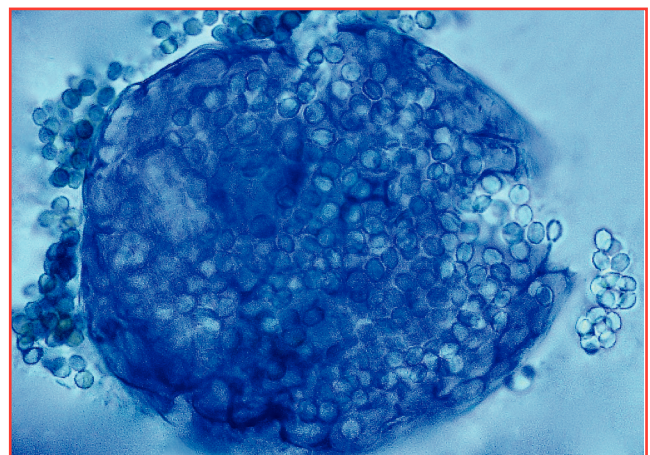


Fig. 2 - Cléistothèce de *A. montevidensis* libérant des ascospores.

ce qui a contribué à une augmentation conséquente de la description de nouvelles espèces au cours des dernières années. Bien que le nombre d'espèces soit en constante évolution et qu'il soit difficile d'en fournir un nombre précis, un des derniers recensements établis par le site de référence www.aspergilluspenicillium.org faisait état de 379 espèces réparties en 26 sections en 2018.

IV. - IMPLICATIONS CLINIQUES

Les avancées taxonomiques ont vite montré la diversité des espèces impliquées en pathologie humaine, bien plus importante que les seules cinq espèces traditionnellement identifiées (*A. fumigatus*, *A. niger*, *A. flavus*, *A. terreus* et *A. nidulans*). En effet, une étude récente a identifié plus de 55 espèces différentes dans des produits pathologiques d'origine humaine, avec une prévalence des espèces cryptiques proche de 30 % (14). De la même manière, Tsang *et al.* ont listé dans la littérature 19 espèces de *Aspergillus* nouvellement décrites depuis 2013, retrouvées à partir de prélèvements humains (15). Plusieurs études rétrospectives ont également établi une prévalence de 10 à 15 % d'espèces cryptiques dans des sécrétions respiratoires humaines (16, 17). Enfin, une étude

rétrospective centrée sur les infections invasives a révélé que les espèces cryptiques étaient responsables de 10 % des cas (18).

De manière intéressante, plusieurs études rétrospectives menées sur des isolats de la section *Nigri* ont montré que *A. niger*, l'espèce princeps, était minoritaire et représentait moins de 10 % des isolats (19, 20), les espèces cryptiques *A. tubingensis* et *A. welwitschiae* étant les principales représentées (Tableau). L'identification reposant uniquement sur la morphologie est donc une cause importante d'erreur au sein de cette section. Concernant les quatre autres principales sections, l'espèce princeps reste largement majoritaire pour les sections *Fumigati* (*A. fumigatus*), *Flavi* (*A. flavus*) et *Terrei* (*A. terreus*), alors qu'au sein de la section *Nidulantes*, l'espèce princeps *A. nidulans* fait jeu égal avec l'espèce cryptique *A. latus*.

Enfin, il a également été observé des profils de résistance aux antifongiques particuliers pour certaines espèces cryptiques par rapport à l'espèce princeps de la section. C'est notamment le cas de la section *Fumigati* où *A. lentulus* et *A. udagawae* présentent *in vitro* une résistance aux antifongiques azolés et à l'amphotéricine B, alors que *A. fumigatus*, l'espèce princeps de cette section, est naturellement

Tableau - Sections et espèces cryptiques notoires

Section (espèce <i>sensu stricto</i>)	Espèces cryptiques	Remarques
<i>Fumigati</i> (<i>A. fumigatus</i>)	<i>A. lentulus</i>	Résistance <i>in vitro</i> aux antifongiques azolés et à l'amphotéricine B
	<i>A. udagawae</i>	Résistance <i>in vitro</i> aux antifongiques azolés et à l'amphotéricine B
	<i>A. thermomutatus</i>	Résistance <i>in vitro</i> aux antifongiques azolés
<i>Flavi</i> (<i>A. flavus</i>)	<i>A. parasiticus</i>	
	<i>A. alliaceus</i>	Résistance à l'amphotéricine B. Facilement différentiable morphologiquement de <i>A. flavus</i>
<i>Nigri</i> (<i>A. niger</i>)	<i>A. tubingensis</i>	Plus fréquent que <i>A. niger</i>
	<i>A. welwitschiae</i>	Plus fréquent que <i>A. niger</i>
<i>Nidulantes</i> (<i>A. nidulans</i>)	<i>A. latus</i>	Aussi fréquent que <i>A. nidulans</i> . CMI ^a plus basse à l'amphotéricine B
	<i>A. sydowii</i>	Fusion des sections <i>Nidulantes</i> et <i>Versicolores</i> . Plus fréquent que <i>A. versicolor</i>
<i>Terrei</i> (<i>A. terreus</i>)	<i>A. citrinoterreus</i>	
<i>Usti</i> (<i>A. ustus</i>)	<i>A. calidoustus</i>	Plus fréquent que <i>A. ustus</i> . Résistance <i>in vitro</i> aux antifongiques azolés

^a CMI, concentration minimale inhibitrice

sensible à ces molécules (Tableau) (21, 22). Au sein de la section *Nidulantes*, *A. latus* semble présenter *in vitro* une meilleure sensibilité à l'amphotéricine B que *A. nidulans*.

Bien que ces données soient encore incomplètes et en pleine évolution, elles mettent au jour l'importance des espèces cryptiques en pratique médicale courante. Il convient donc à un clinicien, pouvant être confronté à un patient présentant un isolat de *Aspergillus*, d'être sensibilisé à ces nouvelles espèces et aux conséquences qui en résultent. Il est tout aussi primordial qu'un biologiste médical connaisse les performances des différents outils d'identification et les applique au laboratoire pour identifier précisément ces espèces cryptiques, dans la mesure du possible.

V. - OUTILS D'IDENTIFICATION DISPONIBLES

L'identification précise des espèces au sein du genre *Aspergillus* reste un défi en routine, même pour des mycologues aguerris. En effet, les caractéristiques macroscopiques et microscopiques des isolats, et notamment la structure de la « tête aspergillaire », sont restées, pendant de nombreuses années, les clés de l'identification. Cependant, la qualité d'identification dépend de l'expérience du personnel et les caractéristiques structurales ne permettent pas la distinction des différentes espèces cryptiques. De plus, certains isolats peuvent, en culture, ne pas produire de « têtes aspergillaires » ou éventuellement très tardivement. Bien que facile à mettre en œuvre, peu coûteuse et ne nécessitant que très peu de matériel, l'identification morphologique permet donc, au mieux, celle de la section et le résultat doit être rendu en conséquence (par exemple, l'identification d'un isolat de *A. fumigatus* uniquement par sa morphologie doit être rendue *Aspergillus* section *Fumigati* ou *A. fumigatus sensu lato*).

L'identification moléculaire est désormais le « *gold standard* » pour une espèce cryptique au sein d'une section (3). Elle repose sur le séquençage de certaines régions d'ADN conservées au sein du genre, mais présentant un certain degré de variabilité entre les espèces. Les régions intragéniques transcrites, communément appelées ITS (*internal transcribed spacers*) du gène codant pour l'ARN ribosomique, sont parmi les plus utilisées pour l'identification moléculaire des champignons. Cependant, pour le genre *Aspergillus*, le séquençage isolé des régions ITS n'est pas suffisamment discriminant pour identifier précisément une espèce cryptique et ne permet généralement qu'une reconnaissance de la section, tout comme l'identification morphologique. On recourt donc à d'autres régions génomiques, notamment une partie des gènes *cmd*, *benA* et *rpb2* codant respectivement pour la calmoduline, la β -tubuline et l'ARN

polymérase II (3). Les séquences de référence de ces différents gènes, pour l'ensemble des espèces du genre *Aspergillus*, sont disponibles sur le site www.aspergilluspenicillium.org. Toutefois, cette approche diagnostique présente un certain coût et nécessite du matériel et des compétences spécifiques. De plus, les temps techniques incompressibles ne permettent généralement pas un rendu rapide du résultat. Enfin, la qualité de l'identification va dépendre de la qualité de la base de données utilisée pour la comparaison des séquences obtenues. Certaines erreurs sont présentes dans les bases généralistes (comme Genbank). Les bases spécialisées, rattachées à des centres de référence en mycologie (comme Mycobank), sont composées de séquences dont l'identification est certaine, mais quelques espèces sont manquantes. Il faut donc être prudent lors de l'utilisation de ces outils. Pour ces raisons, l'identification moléculaire relève donc, pour le moment, principalement du laboratoire spécialisé et est très peu utilisée en routine.

L'utilisation de la spectrométrie de masse MALDI-TOF (pour *Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight*) a révolutionné l'identification des microorganismes en routine (23). Elle repose sur la comparaison du spectre protéique du microorganisme à identifier avec une banque de spectres de référence. C'est particulièrement vrai pour l'identification des bactéries et des levures où la spectrométrie de masse MALDI-TOF s'est démocratisée ces dernières années, mais elle est également applicable pour l'identification des champignons filamenteux, dont les *Aspergillus* (24, 25). Elle a également l'intérêt d'être une technique facilement réalisable en routine et de fournir une identification précise, rapide et à moindre coût (une fois l'automate acquis). Pour les champignons filamenteux, elle présente également l'intérêt de permettre une identification avant l'apparition des fructifications, ce qui est impossible par une caractérisation morphologique. Cependant, jusque très récemment, son application pour l'identification des champignons filamenteux, dont les *Aspergillus*, était limitée par le faible nombre de références de champignons filamenteux intégrées dans les bases de données fournies avec les spectromètres de masse (25). Ainsi les deux bases de données certifiées IVD-CE, Vitek MS v3 (Biomérieux®) et MALDI Bio-Typer (MBT) (Bruker®) ne contiennent respectivement que douze et aucune référence de *Aspergillus*. Afin d'améliorer les performances d'identification des champignons filamenteux, plusieurs bases de données ont été développées et sont dorénavant disponibles. La société Bruker® a produit une extension *research use only* (RUO) de sa base de données (MBT *Filamentous Fungi Library* 3.0), composée de 180 références de champignons filamenteux, dont 30 espèces de *Aspergillus*. L'application indépendante MSI, accessible en ligne gratuitement et dédiée à l'identification des agents fongiques et para-

sitaires à partir de leur spectre de masse, possède quant à elle la plus importante base de données de champignons filamenteux (26). Construite en collaboration avec le BCCM (*Belgian Co-ordinated Collections of Micro-organisms*), elle est composée de 1088 références de champignons filamenteux, dont 162 *Aspergillus* différents. Une étude récente a montré que l'application MSI était capable de différencier les espèces cryptiques de *Aspergillus* de l'espèce princeps au sein d'une section, sur des isolats issus de la routine de plusieurs centres hospitalo-universitaires (14). Quelques erreurs au niveau de l'espèce ont été observées dans sa version 1, mais elles ont été corrigées depuis dans la version 2 actuellement disponible (<https://msi.happy-dev.fr>).

VI. - CONCLUSION

Les évolutions récentes de la taxonomie du genre *Aspergillus* ont mis en évidence une grande diversité d'espèces avec un impact clinique en termes de pathogénicité et de résistance aux antifongiques notable. L'identification précise des espèces en laboratoire devient donc une problématique importante pour la prise en charge des patients, mais aussi pour améliorer les connaissances sur ces « nouvelles » espèces. Actuellement, la spectrométrie de masse MALDI-TOF apparaît comme l'outil de choix pour une identification exacte et rapide en routine, à condition d'utiliser les bases de données adaptées.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- (1) Segal BH. Aspergillosis. *N Engl J Med* 2009 ; **360** (18) : 1870-84.
- (2) Kosmidis C, Denning DW. The clinical spectrum of pulmonary aspergillosis. *Thorax* 2015 ; **70** (3) : 270-7.
- (3) Samson RA, Visagie CM, Houbraeken J, Hong SB, Hubka V, Klaassen CH, *et al*. Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol* 2014 ; **78** : 141-73.
- (4) Hubka V, Kubatova A, Mallatova N, Sedlacek P, Melichar J, Skorepova M, *et al*. Rare and new etiological agents revealed among 178 clinical *Aspergillus* strains obtained from Czech patients and characterized by molecular sequencing. *Med Mycol* 2012 ; **50** (6) : 601-10.
- (5) Gautier M, Normand AC, Ranque S. Previously unknown species of *Aspergillus*. *Clin Microbiol Infect*. 2016 ; **22** (8) : 662-9.
- (6) Micheli PA. Nova plantarum genera iuxta Tournefortii methodum disposita, *Bernardo Paperini*, Firenze ; 1729.
- (7) Bennet JW. An overview of the genus *Aspergillus*. In *Aspergillus* molecular biology and genomics. M. Machida & K. Gomi (Eds). *Caister Academic Press*, Norfolk (UK) ; 2010 : 1-19.
- (8) Link HF. Observationes in ordines plantarum naturales. *Mag Ges Naturf Fr Berl* 1809 ; **3** (1) : 3-42.
- (9) Fresenius G. *Aspergillus fumigatus* Fresen. In *Beiträge zur mykologie*, 1863 : 81-2.
- (10) Pitt JI, Samson RA, Frisvad JC. List of accepted species and their synonyms in the family Trichocomaceae. In *Integration of modern taxonomic methods for Penicillium and Aspergillus classification*. RA Samson & JI Pitt (Eds), *Harwood Academic Publishers*, Reading (UK) ; 2000 : 9-49.
- (11) Norvell LL. Fungal nomenclature. 1. Melbourne approves a new Code. *Mycotaxon* 2011 ; **116** : 481-90.
- (12) Balajee SA, Nickle D, Varga J, Marr KA. Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell* 2006 ; **5** (10) : 1705-12.
- (13) Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Cuenca-Estrella M. Current section and species complex concepts in *Aspergillus* : recommendations for routine daily practice *Ann N Y Acad Sci* 2012 ; **1273** (1) : 18-24.
- (14) Imbert S, Normand AC, Gabriel F, Casaing S, Bonnal C, Costa D, *et al*. Multi-centric evaluation of the online MSI platform for the identification of cryptic and rare species of *Aspergillus* by MALDI-TOF. *Med Mycol* 2019 ; **57** (8) : 962-8.
- (15) Tsang CC, Tang JY, Lau SK, Woo PC. Taxonomy and evolution of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Talaromyces* in the omics era – Past, present and future. *Comput Struct Biotechnol J* 2018 ; **16** : 197-210.
- (16) Castro C, Galán-Sánchez F, Linares MJ, Tejero R, Ruiz M, Serrano ML, *et al*. A prospective survey of *Aspergillus* spp. in respiratory tract samples: species identification and susceptibility patterns. *Med Mycol* 2019 ; **57** (4) : 412-20.
- (17) Alastruey-Izquierdo A, Mellado E, Peláez T, Pemán J, Zapico S, Alvarez M, *et al*. Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother* 2013 ; **57** (7) : 3380-7.
- (18) Balajee SA, Kano R, Baddley JW, Moser SA, Marr KA, Alexander BD, *et al*. Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *J Clin Microbiol* 2009 ; **47** (10) : 3138-41.
- (19) Iatta R, Nuccio F, Immediato D, Mosca A, De Carlo C, Miragliotta G, *et al*. Species distribution and *in vitro* azole susceptibility of *Aspergillus* section *Nigri* isolates from clinical and environmental settings. *J Clin Microbiol* 2016 ; **54** (9) : 2365-72.
- (20) Carrara B, Richards R, Imbert S, Morio F, Sasso M, Zahr N, *et al*. Species distribution and comparison between EUCAST and gradient concentration strips methods for antifungal susceptibility testing of 112 *Aspergillus* section *Nigri* isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2020 ; **64** (7) : e02510-19.
- (21) Lamoth F. *Aspergillus fumigatus*-related species in clinical practice. *Front Microbiol* 2016 ; **7** : 683.
- (22) Alcazar-Fuoli L, Mellado E, Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Rodriguez-Tudela JL. *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother* 2008 ; **52** (4) : 1244-51.
- (23) Seng P, Drancourt M, Gouriet F, La Scola B, Fournier P, Rolain JM, *et al*. Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis* 2009 ; **49** (4) : 543-51.
- (24) Gautier M, Ranque S, Normand AC, Becker P, Packeu A, Cassagne C, *et al*. Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry: revolutionizing clinical laboratory diagnosis of mould infections. *Clin Microbiol Infect* 2014 ; **20** (12) : 1366-71.
- (25) Normand AC, Cassagne C, Gautier M, Becker P, Ranque S, Hendrickx M, *et al*. Decision criteria for MALDI-TOF MS-based identification of filamentous fungi using commercial and in-house reference databases. *BMC Microbiol* 2017 ; **17** (1) : 25.
- (26) Normand AC, Becker P, Gabriel F, Cassagne C, Accoceberry I, Gari-Toussaint M, *et al*. Validation of a new web application for identification of fungi by use of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Clin Microbiol* 2017 ; **55** (9) : 2661-70.

Table des illustrations

Figure 1 : Examen microscopique d'un <i>Aspergillus</i>	6
Figure 2 : Cycle de développement des champignons du genre <i>Aspergillus</i>	7
Figure 3 : Examen microscopique d'une tête aspergillaire	7
Figure 4 : Examen microscopique d'un cléistothèce.	8
Figure 5 : Eléments microscopiques d'une tête aspergillaire.	14
Figure 6 : Exemple d'arbre phylogénétique.	17
Figure 7 : Principe de la spectrométrie de masse.	19
Figure 8 : Exemple d'un spectre de masse.	20
Figure 9 : Représentation schématique du devenir des spores après inhalation.	23
Figure 10 : Scanners pulmonaires d'aspergilloses pulmonaires chroniques.	29
Figure 11 : Scanners pulmonaires d'aspergilloses pulmonaires invasives.	32
Figure 12 : Amphotéricine B : structure et mécanisme d'action.	36
Figure 13 : Mécanisme d'action des antifongiques azolés.	37
Figure 14 : Lecture visuelle d'une CMI par la méthode EUCAST.	39
Figure 15 : Principe des bandelettes à gradient de concentration.	40
Figure 16 : Géloses imprégnées d'une concentration fixe d'antifongique.	41
Figure 17 : Répartition mondiale des isolats résistants d' <i>A. fumigatus</i>	45
Figure 18 : Schéma d'une plaque de microdilution selon la méthode EUCAST.	57
Figure 19 : Répartition par centres des isolats transmis.	60
Figure 20 : Distribution des CMI par antifongiques, toutes sections confondues.	73
Figure 21 : Distribution par type de prélèvements de l'ensemble des isolats et de la section <i>Fumigati</i>	90
Figure 22 : Distribution des isolats en fonction de la pathologie associée.	91
Figure 23 : Facteurs de risque des patients colonisés par une espèce cryptique	95

Table des tableaux

Tableau 1 : Classification des <i>Aspergillus</i>	12
Tableau 2 : Caractéristiques morphologiques des principales espèces d' <i>Aspergillus</i>	14
Tableau 3 : Liste des espèce d' <i>Aspergillus</i> présentes sur la base Bruker <i>Filamentous Fungi Library 3.0</i>	21
Tableau 4 : Liste des espèce d' <i>Aspergillus</i> présentes sur la base MSI 1	22
Tableau 5 : Liste des espèces cryptiques retrouvées dans des prélèvements humains.	35
Tableau 6 : <i>Clinical breakpoints</i> définis par l'EUCAST.	42
Tableau 7 : Sensibilité aux antifongiques des espèces cryptiques.	44
Tableau 8 : Liste des mutations de la protéine Cyp51a.	46
Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées pour le séquençage	54
Tableau 10 : Mélange réactionnel et programme pour la PCR d'amplification.	54
Tableau 11 : Mélange réactionnel et programme pour la PCR de séquençage.	55
Tableau 12 : Répartition des espèces cryptiques récupérées.	61
Tableau 13 : Comparaison des performances des banques MSI 1, MSI 2 et Bruker <i>Filamentous Fungi Library 3.0</i>	71
Tableau 14 : Répartition des CMI pour l'ensemble des espèces cryptiques	72
Tableau 15 : Répartition des CMI pour la section <i>Circumdati</i>	82
Tableau 16 : Répartition des CMI pour la section <i>Nidulantes</i>	83
Tableau 17 : Répartition des CMI pour la section <i>Usti</i>	84
Tableau 18 : Répartition des CMI pour la section <i>Flavi</i>	85
Tableau 19 : Répartition des CMI pour la section <i>Aspergillus</i>	86
Tableau 20 : Répartition des CMI pour la section <i>Nigri</i>	87
Tableau 21 : Répartition des CMI pour la section <i>Terrei</i>	87
Tableau 22 : Répartition des CMI pour les autres sections	88
Tableau 23 : Répartition des isolats en fonction du type de prélèvement.	89
Tableau 24 : Facteurs de risque et caractéristiques des aspergilloses invasives liée à une espèce cryptique	93
Tableau 25 : Comparaison des caractéristiques des aspergilloses invasives liées à une espèce cryptiques et celles liées à <i>Aspergillus fumigatus</i>	94
Tableau 26 : Distribution des isolats cryptiques responsables d'otomycose.	96
Tableau 27 : Distribution des isolats cryptiques responsables d'onychomycose.	97

Épidémiologie et résistance aux antifongiques des espèces cryptiques d'*Aspergillus*

Résumé : Le concept d'espèces cryptiques a révolutionné la taxonomie du genre *Aspergillus* ces dernières années. Plusieurs dizaines d'espèces peuvent désormais être retrouvées dans des prélèvements d'origine humaine, avec une incidence croissante. Cependant, leur identification précise restant difficile, les connaissances concernant leur pouvoir pathogène et leur sensibilité aux antifongiques demeurent incomplètes pour le moment. Le développement récent de l'application en ligne MSI, dédiée à l'identification des microorganismes à partir de leur spectre de masse, a permis de démocratiser l'identification de ces « nouvelles » espèces. La collaboration avec le réseau d'utilisateurs de l'application nous a permis de constituer et d'étudier une importante collection d'isolats cryptiques (390 isolats issus de 69 espèces et 13 sections différentes), combinant une identification moléculaire précise, l'étude des profils de sensibilité aux antifongiques par une méthode de référence et l'implication clinique des isolats. Au cours de ce travail, nous avons mis en évidence des profils de résistance naturelle aux antifongiques, propres à certaines espèces. D'un autre côté, nous avons montré toute la diversité des espèces impliquées en pathologie humaine, dont certaines pour la première fois, ainsi que le tropisme pathogène particulier de quelques espèces. Ce travail nous a donc permis d'améliorer et d'apporter de nouvelles connaissances sur les espèces cryptiques d'*Aspergillus* et souligne toute l'importance de leur identification précise en pratique clinique. La version 2 de l'application MSI améliorée au cours de cette étude, représente donc un outil simple et puissant pour cela.

Mots clés : *Aspergillus*, espèces cryptiques, résistance aux antifongiques, EUCAST, spectrométrie de masse MALDI-TOF, séquençage

Epidemiology and antifungal susceptibility of *Aspergillus* cryptic species

Abstract: In recent years, the cryptic species concept has revolutionized the *Aspergillus* genus taxonomy. Henceforth, dozens of species could be found in human samples, with an increasing incidence. However, as their identification remains a challenge, few is known regarding their pathogenicity or their antifungal susceptibility. The recent development of the MSI web application dedicated to the microorganism's identification from their mass spectra, has improved these "new" species identification in numerous centers. The collaboration with this network of users allowed us to collect and study a large collection of cryptic isolates (390 isolates from 69 species and 13 sections), combining an accurate DNA sequence-based identification, the antifungal susceptibility testing by reference method and the clinical involvement. We brought evidence for species-dependent antifungal resistance patterns. We also highlighted the extent of species diversity involved in human disease, including some species never described, and the species-dependent pathogenicity patterns for some species. Thus, this work improved the knowledge on *Aspergillus* cryptic species and underline the importance of their accurate identification in clinical practice. The new version 2 of the MSI application, upgraded during this study, stand for an easy and powerfull tool for this.

Keywords: *Aspergillus*, cryptic species, antifungal susceptibility, EUCAST, MALDI-TOF mass spectrometry, DNA sequencing