

Université de Montréal

**Prévalence et mécanismes de résistance aux triazolés des espèces d'*Aspergillus* section
*Fumigati***

par

Maxime Parent-Michaud

Département de microbiologie, infectiologie et immunologie

Faculté de Médecine

Mémoire présenté en vue d'obtention du grade de

M. Sc. en Microbiologie et immunologie

Mars 2018

©, Maxime Parent-Michaud, 2018

Résumé

Aspergillus fumigatus est le principal agent causal de l'aspergillose invasive. En Europe, un nombre croissant d'isolats cliniques d'*A. fumigatus* présentent une résistance, à la fois *in vivo* et *in vitro*, aux principaux antifongiques utilisés en traitement, soit les triazolés. De plus, plusieurs espèces d'*Aspergillus*, morphologiquement et génétiquement semblables à *A. fumigatus*, sont souvent mal identifiées dans les laboratoires diagnostiques, et présentent une résistance intrinsèque aux triazolés. Les mécanismes de résistance de ces espèces d'*Aspergillus* de la section *Fumigati* sont très peu connus. Dans ce projet, l'étude rétrospective d'une collection de souches cliniques d'*Aspergillus* isolées à l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont a révélé une prévalence de 1,4% de ces espèces dites « cryptiques » d'*Aspergillus*. Le taux de résistance parmi tous les isolats d'*Aspergillus* section *Fumigati* a été évalué à 1,0%. L'analyse des mécanismes de résistance aux triazolés a permis d'impliquer les pompes à efflux dans la résistance des espèces *Aspergillus turcosus* et *A. fumigatus*, alors que les espèces *Aspergillus thermomutatus* et *Aspergillus lentulus*, résistantes aux triazolés, auraient un mécanisme davantage relié à des mutations du gène *cyp51a*.

Mots clés :

Aspergillus section *Fumigati*, triazolés, résistance, *cyp51a*, pompes à efflux, espèces cryptiques

Abstract

Aspergillus fumigatus is the principal agent of invasive aspergillosis. A growing number of *A. fumigatus* isolates in Europe are found to be resistant to the triazoles, the primary antifungals used in treatment. Moreover, many “cryptic” *Aspergillus* species, morphologically and genetically similar to *A. fumigatus*, are misidentified in the clinical diagnostic laboratory, and several of these “cryptic” species are intrinsically resistant to the triazoles. Resistance mechanisms of “cryptic” *Aspergillus* section *Fumigati* species are not well known. In the present retrospective study, conducted on a collection of *Aspergillus* clinical isolates from Maisonneuve-Rosemont Hospital, the prevalence of the « cryptic » species among all *Aspergillus* section *Fumigati* was 1.4%, and 1.0% of all isolates in the collection were azole-resistant. Analysis of resistance mechanisms produced evidence for efflux pump-mediated resistance in *Aspergillus turcosus* and *A. fumigatus* isolates, in contrast to the triazole-resistant *Aspergillus thermomutatus* and *Aspergillus lentulus* species which display resistance likely mediated by mutations in the *cyp51a* gene.

Key words:

Aspergillus section *Fumigati*, triazoles, resistance, *cyp51a*, efflux pumps, cryptic species

TABLE DES MATIÈRES

Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures.....	vii
Liste des sigles et abréviations	ix
Remerciements	xii
Introduction.....	1
1. Genre <i>Aspergillus</i>	1
1.1. Biologie des <i>Aspergillus</i>	1
1.2. <i>Aspergillus fumigatus</i>	5
1.3. Les <i>Aspergillus</i> « cryptiques » de la section <i>Fumigati</i>	12
2. Aspergillose	18
2.1. Formes cliniques de l'aspergillose	19
2.2. Épidémiologie clinique de l'aspergillose invasive	22
2.3. Diagnostic	23
2.4. Traitement.....	27
3. Résistance aux triazolés	29
3.1. Mécanismes	31
3.2. Épidémiologie de la résistance	34
4. Génomique.....	35
Hypothèses et objectifs	37
Matériel et méthodes.....	38
Collection d'isolats cliniques d' <i>Aspergillus</i>	38
Souches contrôles et séquences de référence	38

Récolte des conidies.....	39
Dépistage phénotypique des espèces <i>Fumigati</i> cryptiques.....	39
Dépistage de la résistance aux triazolés.....	40
Épreuve de sensibilité aux antifongiques de CLSI.....	41
Examen des dossiers médicaux.....	43
Essai du Nile red pour les pompes à efflux.....	43
Lecture par puits	44
Lecture par cellule	45
Essai d'inhibition des pompes à efflux	46
Extraction d'ADN génomique	47
Identification par séquençage génique.....	47
Séquençage complet du génome.....	49
Amplification PCR du gène <i>cyp51a</i> d' <i>A. lentulus</i>	47
Identification des gènes métaboliques et de pompes à efflux.....	49
Alignements d'AtrR, de HapE et de Cyp51A.....	50
Numéros d'accès.....	50
Logiciels informatiques	50
Résultats.....	52
Discussion.....	78
Bibliographie	86
Annexe.....	xii

Liste des tableaux

Tableau I: Prévalence d'isolats d'espèces cryptiques d' <i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i> dans la littérature.....	17
Tableau II : Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des gènes à l'étude.....	49
Tableau III. Maladies sous-jacentes et conditions associées à <i>Aspergillus</i> des patients avec un isolat d'espèces cryptique d' <i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i> sensible ou résistant aux triazolés et de l'isolat résistant aux triazolés d' <i>A. fumigatus</i>	60
Tableau IV: Caractéristiques génomiques des souches d' <i>Aspergillus</i> séquencées.....	69
Tableau V : Résumé des résultats obtenus chez les isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i> résistants aux triazolés.....	85
Tableau A1. Pourcentage d'identité des gènes de pompes à efflux et des gènes métaboliques impliqués dans la résistance aux triazolés des isolats cryptiques d' <i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>	xii

Liste des figures

Figure 1. Tête aspergillaire bisériée (gauche) et unisériée (droite).	2
Figure 2. Cycle sexué et asexué du genre <i>Aspergillus</i>	3
Figure 3. Cycle saprophytique et pathogénique d' <i>A. fumigatus</i>	6
Figure 4. Réponse immunitaire de l'hôte souffrant d'asthme sévère avec sensibilisation fongique ou aspergillose bronchopulmonaire allergique face à une infection fongique. ...	9
Figure 5. Formes cliniques de l'aspergillose en fonction de la réponse immunitaire.	19
Figure 6. Distribution des souches et antifongiques dans une plaque de 96 puits pour le dépistage de la résistance aux triazolés.	41
Figure 7. Configuration d'une plaque d'antifongigramme complet selon la méthode M38-A2 du CLSI.	43
Figure 8 : Exemple de croissance et de thermotolérance de souches cryptiques d' <i>Aspergillus</i> probables.	53
Figure 9. Exemple de résultat d'amplification PCR du gène <i>benA</i> des isolats d' <i>A. fumigatus</i> à l'étude.	54
Figure 10. Arbre phylogénétique des séquences de <i>benA</i> des isolats suspectés d'être cryptiques et des souches de référence.	55
Figure 11. Algorithme d'identification et de test de sensibilité des 1184 isolats d' <i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>	56
Figure 12. Exemple de résultat d'un antifongigramme complet selon méthode M38-A2 du CLSI.	58

Figure 13. Résultats de la méthode de Nile red en plaque pour les souches contrôles.	63
Figure 14. Résultats finaux des essais d'optimisation des conditions de croissance des tubes germinatifs.	64
Figure 15. Accumulation de Nile red chez les isolats sensibles et résistants d'<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i>.	66
Figure 16. Essais d'inhibition des pompes à efflux.	68
Figure 17. Gel d'agarose des trois fragments d'amplification du <i>cyp51a</i> de la souche d'<i>Aspergillus lentulus</i> HMR AF 1185.	71
Figure 18. Analyse phylogénique des séquences en acides aminés de Cyp51A des isolats d'<i>Aspergillus</i> section <i>Fumigati</i> de référence et de l'étude.	72
Figure 19. Alignement des séquences en acides aminés de Cyp51A des isolats séquencés en entier avec les souches de référence sensibles aux triazolés <i>A. fumigatus</i> CM237 et AF293 et résistants <i>A. lentulus</i> CM1290 et IFM54703T.	73
Figure 20. Alignement des séquences en acides aminés d'AtrR des souches séquencés en entier avec les souches de référence <i>A. oryzae</i> RIB40 et <i>A. fumigatus</i> AF293.	75
Figure 21. Alignement des séquences en acides aminés de HapE des souches séquencés en entier avec la souche contrôle sensible aux triazolés <i>A. fumigatus</i> AF293.	77

Liste des sigles et abréviations

ABC : *ATP-binding cassette*

ABPA : aspergillose bronchopulmonaire allergique

AI : aspergillose invasive

APCC : aspergillose pulmonaire cavitaires chronique

CLR : *C-lectin like receptor*, récepteur de type C-lectine

CLSI : *Clinical and Laboratory Standards Institute*

CME : concentration minimale effectrice

CMI : concentration minimale inhibitrice

CZD : *Czapek-Dox agar*

ECV : *epidemiological cutoff value*, valeur de seuil épidémiologique

EIA : *enzyme immunoassay*

EUCAST : *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*

IFI : infection fongique invasive

IPE : inhibiteur de pompes à efflux

ITS : *internal transcribed spacers*

LBA : lavage bronchoalvéolaire

MDL : microdilutions en milieu liquide

MEA : *malt extract agar*

MFS : *major facilitator superfamily*

NLR : *NOD-like receptor*, récepteur de type NOD

PAMP : *pathogen-associated molecular pattern*, motif moléculaire associé aux pathogènes

PCR-RFLP : *polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*

PRR : *pattern recognition receptor*, récepteur de reconnaissance de motifs moléculaires

RFU : *relative fluorescence unit*, unité relative de fluorescence

SDA : Sabouraud dextrose agar

SNP : *single nucleotide polymorphism*, polymorphisme d'un simple nucléotide

SSI : Station Spatiale Internationale

TD : tomodesitométr

TLR : *Toll-like receptor*, récepteurs de type Toll

WSG : *whole genome sequencing*

*The saddest aspect of life right now is
that science gathers knowledge faster
than society gathers wisdom.*

-Isaac Asimov

There is nothing impossible to him who will try.

-Alexandre le Grand

Remerciements

Merci au Dr Simon F. Dufresne de m'avoir donné ma chance, de m'avoir accepté comme stagiaire avant même qu'il n'ait de laboratoire où travailler, de son écoute et de sa compréhension.

Merci au Dr Louis de Repentigny pour son expérience et de m'avoir accueilli dans ses laboratoires, de son aide pour la rédaction des articles, des rapports et présentations.

Merci à Philippe Dufresne, Éric Fournier et Christine Martineau pour leur précieux temps, leur expertise et leur aide inestimable.

Merci à mon copain pour m'avoir donné le courage de poursuivre mon aventure jusqu'à la fin, d'avoir été à mes côtés et de m'avoir encouragé.

Merci à ma famille qui a toujours cru en moi et qui m'encourage à poursuivre mes rêves.

Un grand merci à tous.

Introduction

1. Genre *Aspergillus*

1.1. Biologie des *Aspergillus*

Écologie

Le genre *Aspergillus*, de la classe des Ascomycètes, est composé d'environ 250 espèces (Alastruey-Izquierdo et al., 2012), regroupant des espèces saprophytes, ubiquitaires et essentielles à l'environnement, qu'on retrouve sur les sols, les piles de compostes, les fruits, les débris organiques, les animaux et les humains (Sugui et al., 2014a). En effet, les humains inhalent plusieurs centaines de conidies par jour (Latge, 1999). L'espèce *A. fumigatus* est cependant la plus ubiquitaire parmi les *Aspergillus*, par sa capacité de survie dans des conditions environnementales extrêmes. Cette grande abondance environnementale, de même que sa virulence relative (voir section « virulence »), en font la principale espèce impliquée en pathologie humaine (Sugui et al., 2014a).

Structure

Comme tous les champignons filamenteux, les conidies d'*Aspergillus* croissent dans un milieu favorable et produisent des hyphes. Ces hyphes forment un réseau appelé mycélium. Lorsqu'une colonie d'*Aspergillus* arrive à maturité, celle-ci présente des changements morphologiques correspondant au mode de reproduction asexué : une cellule-pied s'allonge, donne naissance à un conidiophore qui se termine en une vésicule couronnée de phialides en forme de vases, produisant les conidies, petites propagules sphériques contenant le matériel génétique et responsable de la propagation dans l'environnement, par l'air et l'eau (Delorme,

1997; Latge, 1999; Samson et al., 2014). Selon l'espèce d'*Aspergillus*, les phialides peuvent se présenter en un seul étage, unisériées, ou en deux étages, bisériées (Figure 1) (Delorme, 1997).

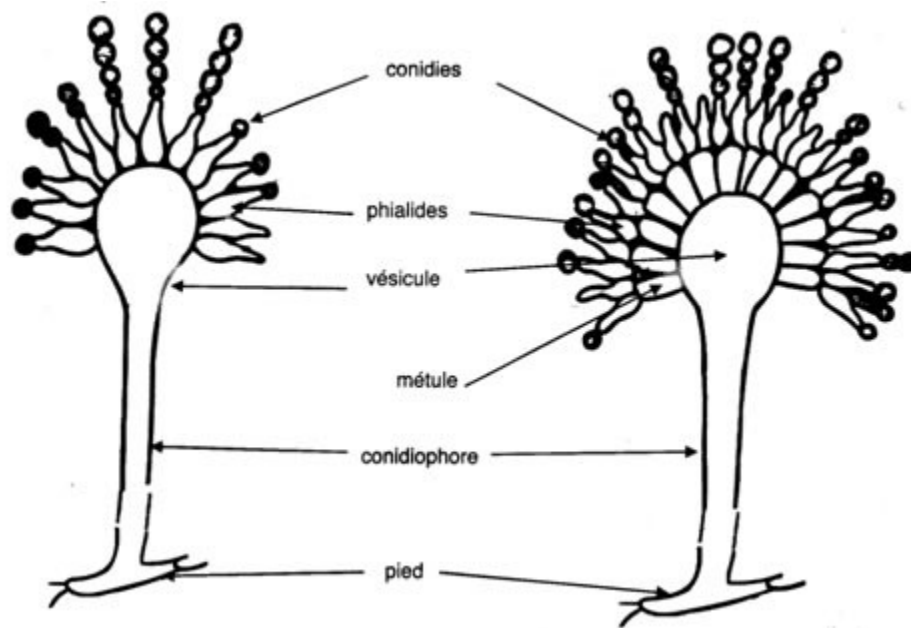


Figure 1. Tête aspergillaire bisériée (gauche) et unisériée (droite). Figure tirée (Guillaume et Alcindor, 2006) avec autorisation.

Reproduction

La reproduction des champignons peut être de type asexuée ou sexuée. Seulement un cinquième des espèces de champignons ont un cycle sexué connu (Dyer et Paoletti, 2005). Dans le cas du genre *Aspergillus*, quelques espèces seulement ont été décrites comme ayant un cycle de reproduction sexuel. C'est le cas d'*A. fumigatus* (Kwon-Chung et Sugui, 2009). La reproduction asexuée se conclue par la production de conidies haploïdes (avec une seule copie de chaque chromosome) (Figure 2). La reproduction asexuée permet, entre autres, une répllication et une dissémination clonale, avec quelques mutations spontanées durant la conidiogenèse. La reproduction asexuée implique un faible coût métabolique (Delorme, 1997;

Dyer et Paoletti, 2005). La reproduction sexuée, quant à elle, nécessite la fusion nucléaire de deux cellules appartenant à des types reproductifs distincts, soit MAT1-1 et MAT1-2 (Delorme, 1997; O'Gorman et al., 2009), produisant ainsi un téléomorphe diploïde. Les ascospores, produites par méiose de la cellule fusionnée, sont contenues à l'intérieur de structures spécialisées nommées asques, elles-mêmes regroupées dans des cléistothèques, qui sont des corps de fructification sexuels (Sugui et al., 2014a). La reproduction sexuée est souvent favorisée dans les milieux faibles en nutriments, et permettent ainsi de diversifier le patrimoine génétique de la progéniture afin d'augmenter ses chances de survie, notamment par la recombinaison génétique entre les deux cellules mères, lors de la méiose (Dyer et Paoletti, 2005).

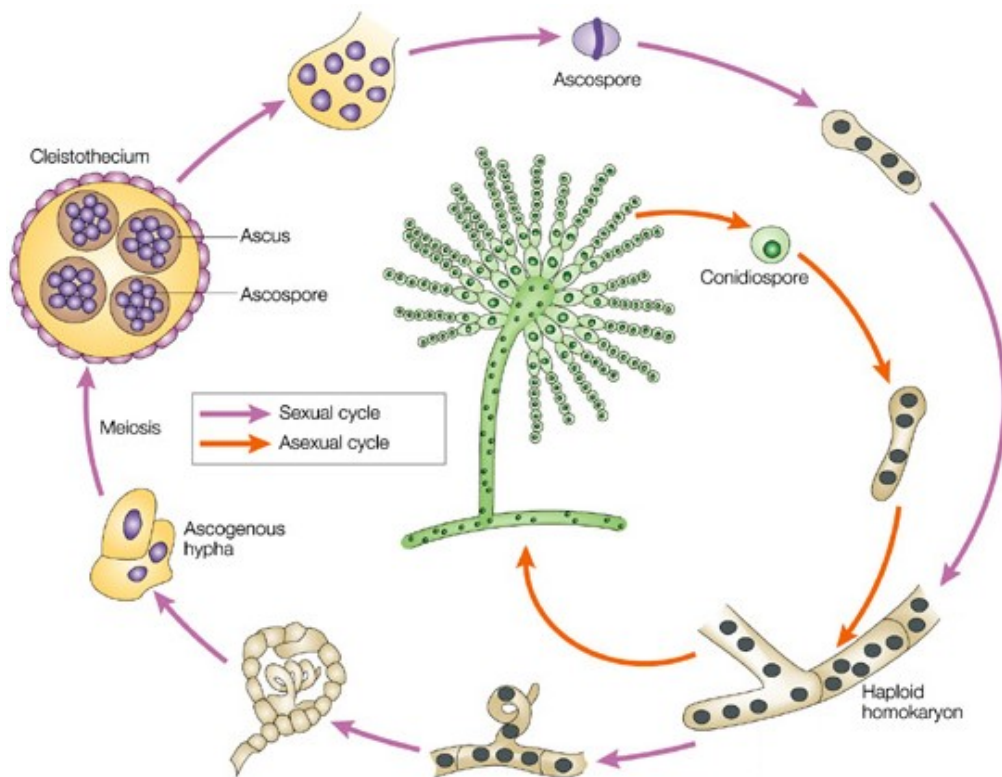


Figure 2. Cycle sexué et asexué du genre *Aspergillus*. Figure tirée de (Casselton et Zolan, 2002) avec autorisation.

Diversité et taxonomie

En 1729, un prêtre nommé Micheli décrit un champignon produisant des spores en chaînes et dont la morphologie ressemble beaucoup à l'aspergillum, goupillon utilisé pour disperser l'eau bénite. De part cette comparaison, il décide de nommer le champignon « *Aspergillus* » (Sugui et al., 2014a).

Le genre *Aspergillus* est monophylétique (Samson et al., 2014). Le genre a d'abord été subdivisé en groupes (Raper et Fennell, 1965), mais la nomenclature de « section » a été adoptée en 1985 (Gams et al., 1986). La section *Fumigati* est formée de cinq clades possédant des caractères phylogéniques, morphologiques et physiologiques distincts (Yaguchi et al., 2007). Le premier clade (I) regroupe les souches typiques d'*A. fumigatus* et les souches d'*Aspergillus arvii*. Le second clade (II) comprend les souches d'*Aspergillus lentulus* et d'*Aspergillus fumisunnematus*. Le troisième clade (III) est composé des souches d'*Aspergillus fumigatiaffinis* et d'*Aspergillus novofumigatus*. Le quatrième groupe (IV) regroupe les souches atypiques d'*A. fumigatus* et les souches d'*Aspergillus viridinutans*, alors que le cinquième groupe (V) est composé des souches d'*Aspergillus brevipes*, d'*Aspergillus duricaulis* et d'*Aspergillus unilateralis* (Balajee et al., 2007). Anciennement, les formes sexuées et asexuées étaient identifiées sous plusieurs genres: *Aspergillus*, *Neosartorya*, *Petromyces*, *Emericella*, etc. (Sugui et al., 2014a). À présent, toutes les formes sont rapportées sous le genre *Aspergillus*, assurant ainsi une uniformité de la nomenclature (Samson et al., 2014).

Les régions ITS (*Internal transcribed spacers*) du gène codant pour l'ARN ribosomal (ADNr) permettent d'identifier les champignons (Alastruey-Izquierdo et al., 2014; Samson et al., 2007). Spécifiquement, les régions ITS1 et ITS2, qui se trouvent de chaque côté de la sous-

unité 5,8S de l'ADNr, sont souvent utilisées (Balajee et al., 2007). En effet, ces régions génomiques contiennent des séquences variables qui permettent de distinguer les genres et les espèces (Henry et al., 2000). Dans le cas du genre *Aspergillus*, ces séquences ITS permettent d'identifier la section d'appartenance de l'isolat. Par contre, les espèces à l'intérieur d'une même section sont trop rapprochées génétiquement pour permettre l'identification à l'aide du séquençage des ITS. Des gènes présentant une plus grande variabilité interspèces sont nécessaires pour distinguer les espèces à l'intérieur d'une même section. Le gène codant la β -tubuline (*BenA*) est par conséquent largement utilisé à cette fin (Balajee et al., 2007; Samson et al., 2007). Le gène de la calmoduline (*CaM*) est également discriminatif et utile pour la phylogénie.

1.2. *Aspergillus fumigatus*

Caractéristiques morphologiques/biologiques

L'*Aspergillus fumigatus*, principal représentant de la section *Fumigati*, est un champignon hétérothallique produisant, dans son mode de reproduction asexué, des conidies haploïdes échinulées vertes de 2,5 à 3 μm de diamètre (Sugui et al., 2014a) (Figure 3). Les phialides sont unisériées et se trouvent à l'extrémité apicale de la vésicule (Latge, 1999). En plus d'être thermophile, il peut survivre à des pH extrêmes. *A. fumigatus* peut croître à des températures allant de 12°C à 65°C et des pH de 2,2 à 8,8, ce qui permet non seulement sa croissance dans une diversité de conditions environnementales, mais aussi sa capacité d'exercer un pouvoir pathogène (Sugui et al., 2014a).

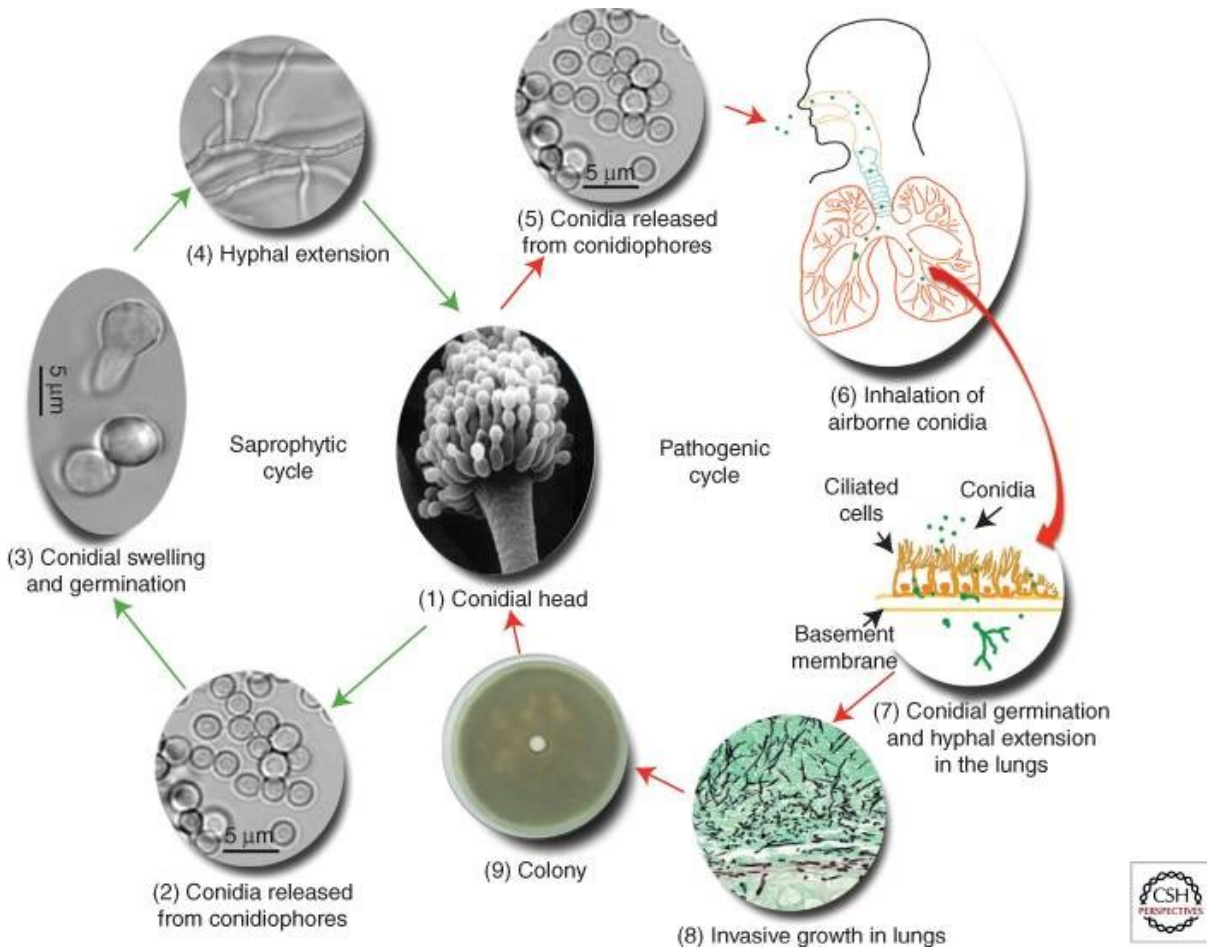


Figure 3. Cycle saprophytique et pathogénique d'*A. fumigatus*. Figure tirée de (Sugui et al., 2014a) avec autorisation.

Facteurs de virulence/pathogénicité

Facteurs de virulence putatifs

Bien qu'*A. fumigatus* soit le champignon filamenteux le plus pathogène, il est important de comprendre que ce champignon infecte très rarement les hôtes immunocompétents. En effet, plus l'hôte a un système immunitaire faible, plus le champignon est propice à causer une maladie (Sugui et al., 2014a).

Des molécules présentes à la surface des conidies contribuent à la virulence d'*Aspergillus*. Les exopolysaccharides, un composant important de la matrice extracellulaire, sont impliqués dans l'adhérence des conidies germées et des hyphes aux parois pulmonaires (Sheppard, 2011). De plus, les conidies mutantes dépourvues de l'hydrophobine/adhésine RodA conservent la capacité de causer l'AI (aspergillose invasive), mais induisent une plus faible réponse immunitaire de l'hôte (Latge, 1999; Sugui et al., 2014a). Ce polypeptide présent à la surface des conidies empêche leur reconnaissance (Aimanianda et al., 2009; Rambach et al., 2015) et leur phagocytose par les macrophages, et confère la résistance au stress oxydatif produit par ces phagocytes (Abad et al., 2010; Paris et al., 2003). De plus, les conidies sont recouvertes d'un pigment, la mélanine, qui est responsable de leur couleur verte caractéristique (Latge, 1999). La mélanine cause l'inhibition de l'acidification des phagolysosomes des phagocytes (Heinekamp et al., 2012; Rambach et al., 2015; Thywissen et al., 2011). En effet, les conidies pigmentées sont davantage virulentes que les non-pigmentées (Latge, 1999; Sugui et al., 2014a). Cependant, dans un modèle murin de l'aspergillose chez la souris immunosupprimée à l'aide de corticostéroïdes, les conidies dépourvues de pigments conservent malgré tout la capacité de causer l'AI (Latge, 1999).

L'*A. fumigatus* induit plusieurs déficiences immunitaires chez l'hôte par la production d'une molécule toxique, la gliotoxine. Cette molécule de la classe des épithiodioxopiperazines, retrouvée dans une grande variété d'espèces fongiques, a des propriétés immunosuppressives très importantes. En effet, elle permet l'inhibition de la phagocytose des macrophages, induit l'apoptose, bloque l'activation des cellules B et T et la génération des cellules cytotoxiques par le blocage de la voie NFκB (Scharf et al., 2012). Toutefois, les souches qui ne produisent pas de gliotoxine sont quand même pathogènes (Latge,

1999). En effet, des souches manquant cette enzyme cytotoxique induisent la même réponse immunitaire que celles complémentées (Chiang et al., 2008; Kamaï et al., 2009; Urb et al., 2009).

Deux protéases permettent de dégrader la couche de collagène et d'élastine des poumons, soit Alp, une serine protéase alcaline, et Mlp, une métalloprotéase. Un mutant Δalp est incapable de dégrader l'élastine. Néanmoins, les mutants Δalp , Δmlp et $\Delta alp+\Delta mlp$ sont tous capables d'infecter et tuer les souris immunosupprimées (Latge, 1999).

Dans les lésions cavitaires pulmonaires, *A. fumigatus* se trouve en environnement hypoxique. Grâce à différentes enzymes, une pyruvate décarboxylase (PdcA) et une alcool déshydrogénase (AlcC), le champignon est capable de fermenter la source de carbone présente et de former de l'éthanol. L'alcool déshydrogénase a été démontrée comme ayant un rôle important dans la pathogénèse de l'aspergillose pulmonaire invasive, car en absence de ce gène précis, la souche d'*A. fumigatus* croit beaucoup moins bien et les dommages tissulaires sont réduits (Grahl et al., 2011).

Mécanismes de défense de l'hôte contre *A. fumigatus*

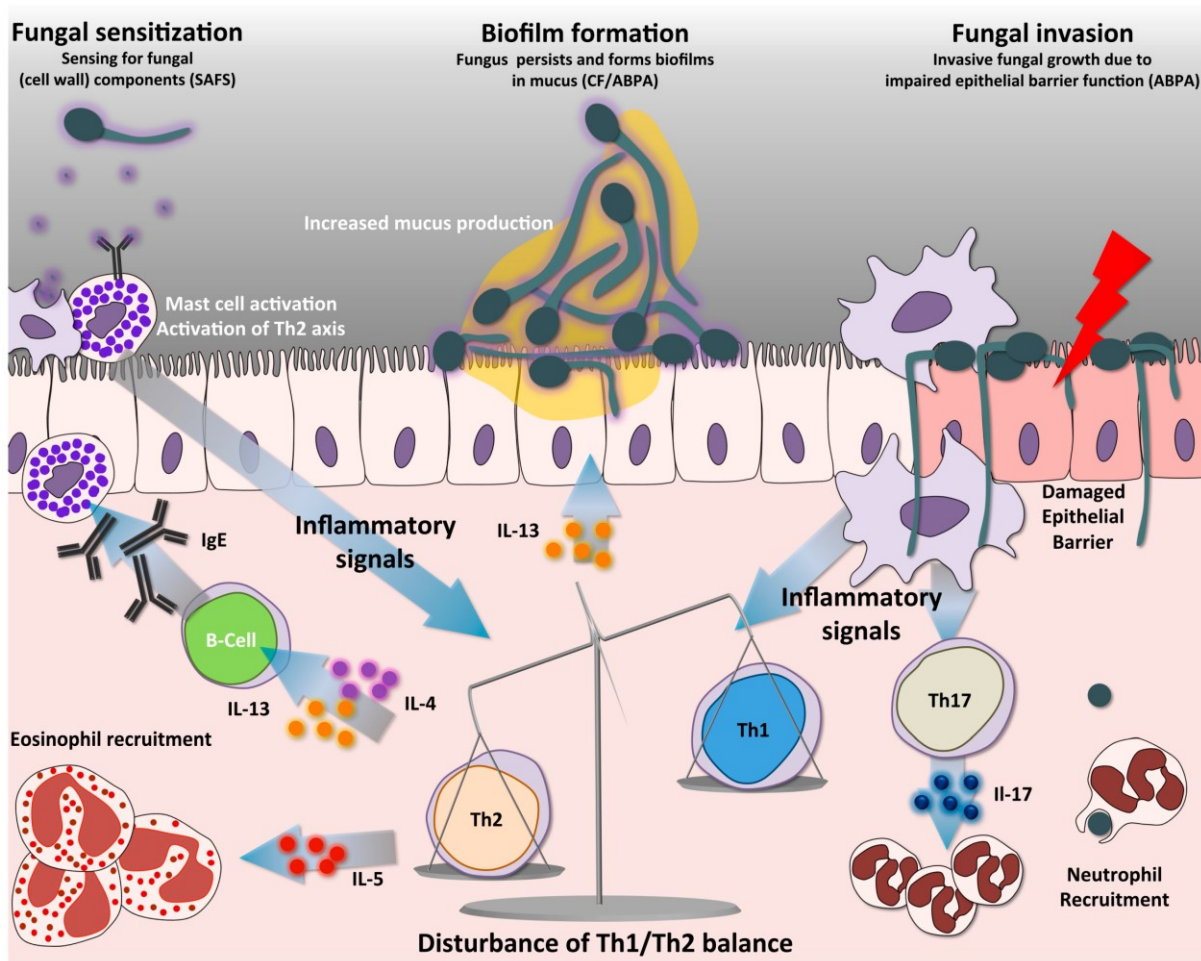


Figure 4. Réponse immunitaire de l'hôte souffrant d'asthme sévère avec sensibilisation fongique ou aspergillose bronchopulmonaire allergique face à une infection fongique. La réponse antiinflammatoire élevée causée par les cellules T_H2 prévient la réponse protectrice des cellules T_H1 . La surproduction de mucus dans les poumons permet la formation de biofilms. Figure tirée de (Dewi et al., 2017) avec autorisation.

En présence d'un système immunitaire normal, les espèces d'*Aspergillus* sont incapables de produire une infection. Ce n'est que dans des cas de déficience ou suppression immunitaire

que le pathogène opportuniste peut infecter l'hôte, comme lors de traitements aux corticostéroïdes (Figure 4).

Le système immunitaire inné, surtout les cellules phagocytaires, représente le principal mécanisme de défense anti-*Aspergillus*, en particulier au niveau du tractus respiratoire. Toutefois, les cellules NK et l'immunité adaptative, cellulaire et humorale, ont aussi un certain rôle (Brown et al., 2012).

À la suite de leur inhalation dans les voies respiratoires les conidies sont phagocytées et inactivées par les cellules épithéliales. Les conidies germées, quant à elles, induisent la sécrétion de médiateurs proinflammatoires (Chaudhary et al., 2012). Puisque le processus de germination des conidies change les composantes et protéines à la surface de celles-ci, les cellules et récepteurs qui interagissent avec les diverses formes sont différents (Park et Mehrad, 2009).

Les PRRs (récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires) comprennent les TLRs (récepteurs de type Toll), les NLRs (récepteurs de type NOD) et les CLR (récepteurs de type C-lectine). Les PRRs reconnaissent des PAMPs (motifs moléculaires associés aux pathogènes), tels que certains polysaccharides ou acides nucléiques microbiens. Chez l'humain, le TLR2 reconnaît les polysaccharides fongiques, alors que NOD2 reconnaît les muramyldipeptides. Ces deux récepteurs activent la voie de signalisation NFκB des cellules immunitaires (principalement les cellules présentatrices d'antigènes et les cellules de Paneth), induisant la production des médiateurs immunitaires par la voie de signalisation MyD88, nécessaire pour induire une réponse en cellules NK et en cytokines TNF-alpha, IL-1 et IL-6 suffisante pour prévenir l'invasion (Park et Mehrad, 2009; Wu et al., 2015).

Les protéines A et D, qui sont des CLR retrouvés dans le surfactant pulmonaire, favorisent l'agglutination et la liaison des conidies aux macrophages alvéolaires. La voie du complément est activée par la reconnaissance des conidies par la sous-unité C3. En parallèle, la Pentraxin-3 lie le galactomannane et facilite la reconnaissance des conidies par les macrophages, neutrophiles et cellules dendritiques, qui expriment la Dectin-1, récepteur de 1-3-β-D-glucane (Park et Mehrad, 2009). Le TLR9 a été démontré *in vivo* comme reconnaissant l'ADN fongique CpG non-méthylé, initiant la réponse des cellules dendritiques plasmacytoïdes et dérivées de la moelle osseuse.

Les macrophages et les neutrophiles sont les principales cellules phagocytaires responsables de la protection contre l'infection à *A. fumigatus*. Le taux d'élimination par les macrophages alvéolaires des conidies inhalées est de 90% en 24h (Latge, 1999). Les neutrophiles, quant à eux, se collent à la surface des hyphes et produisent, par l'induction de leur poussée oxydative, des radicaux libres de l'oxygène (H₂O₂, O₂) qui tuent les hyphes d'*Aspergillus*. Les neutrophiles sont davantage responsables de la destruction des hyphes, plutôt que des conidies. *In vitro*, 50% des hyphes sont tuées après 2 heures d'incubation avec les neutrophiles. Les plaquettes se lient également à la paroi des hyphes (Latge, 1999), par l'interaction avec la mélanine et l'hydrophobine/adhésine RodA (Rambach et al., 2015). En effet, la mélanine présente à la surface des hyphes induit la réponse immunitaire produite par les plaquettes. Bien que les plaquettes inhibent la germination des conidies et la croissance des hyphes, leur activation parfois excessive est la cause de thromboses et de dommages tissulaires caractéristiques de l'aspergillose invasive (Rambach et al., 2015). Dans le cas de l'hydrophobine/adhésine RodA, celle-ci a l'effet opposé de la mélanine et inhibe la réponse des plaquettes à l'endroit d'*Aspergillus* (Rambach et al., 2015).

Les sous-populations T_H1 (essentielle à la protection immunitaire contre les champignons) et T_H17 (essentielle à l'immunité des muqueuses buccale et respiratoire) des lymphocytes T CD4, ainsi que les macrophages produisent des cytokines et chimiokines qui permettent l'activation des cellules responsables de la réponse immunitaire à l'égard de l'*Aspergillus* (Figure 4). La régulation de cette réponse immunitaire est assurée par les cytokines anti-inflammatoires produites par les sous-populations T_H2 et T_{reg} , qui permettent d'éviter une réponse immunitaire exagérée pouvant causer des dommages tissulaires (Brown et al., 2012). En effet, la réponse immunitaire peut être exagérée chez certains types de patients et les dommages tissulaires résultants contribuent à la pathogénèse de certaines formes d'aspergillose, tel que l'ABPA.

Les défauts quantitatifs ou fonctionnels des neutrophiles augmentent de façon toute particulière le risque d'AI. Les gens les plus à risque sont les patients atteints d'une neutropénie profonde et prolongée, de même que les patients atteints d'un déficit immunitaire congénital, la granulomatose septique chronique, dans laquelle les neutrophiles sont incapables de produire les dérivés toxiques d'oxygène. Les patients atteints d'un déficit isolé de l'immunité cellulaire adaptative, comme ceux avec VIH/SIDA, ne sont pas à risque élevé d'AI. Au contraire, les patients avec une réponse immunitaire exagérée (hypersensibilité), peuvent aussi être atteints de certaines formes d'aspergillose, comme l'ABPA, dans lesquelles le dommage tissulaire est causé par l'hôte lui-même, comme l'ABPA (Figure 4; voir section « Aspergillose » ci-bas).

1.3. Les *Aspergillus* « cryptiques » de la section *Fumigati*

Tel que mentionné ci-haut, la section *Fumigati* comprend 51 espèces distinctes (Giusiano et al., 2017). Les espèces appartenant à la section *Fumigati* se caractérisent par la morphologie

microscopique des têtes aspergillaires en colonne qui contiennent, à l'extrémité du conidiophore, une vésicule en forme de goupillon. Surmontant cette vésicule, on retrouve des phialides unisériées qui produisent de longues chaînes de conidies de couleur bleu-vert à vert pâle, mesurant de 2,5 à 3,5 μm de diamètre (Sugui et al., 2014a). Ces caractéristiques sont communes à toutes les espèces de la section. Les espèces autres que *fumigatus* peuvent donc être confondues avec *A. fumigatus* lorsque la morphologie seule est utilisée pour l'identification, que ce soit en laboratoire de microbiologie clinique ou environnementale. Pour cette raison, les espèces autres que *fumigatus* ont été qualifiées de « cryptiques ». Ces dernières ont été mises en évidence surtout depuis les avancements en biologie moléculaire et l'apparition de l'identification basée sur la séquence génomique. En effet, ces espèces ont été définies parce qu'elles étaient phylogénétiquement distinctes. Cependant, certaines ont été confirmées comme « biologiquement » distinctes selon les définitions classiques d'espèces, c'est-à-dire par l'incapacité de reproduction sexuée inter-espèces (Sugui et al., 2014b). Il y a tout de même certaines différences phénotypiques entre les espèces de la section *Fumigati*, incluant certaines caractéristiques morphologiques et le profil de sensibilité aux antifongiques. Ces différences seront détaillées plus bas.

Morphologie

Certaines espèces non-*fumigatus* de la section *Fumigati* se distinguent soit par leur faible pigmentation ou sporulation, la présence d'asques (qui témoigne d'une reproduction sexuée homothallique) et une croissance atypique ou absente à température élevée (Lamoth, 2016). En effet, la majorité des espèces cryptiques ne peuvent croître à 50°C, contrairement à *A. fumigatus* qui possède la capacité de croître à cette température. Inversement, *A. fumigatus* ne peut croître à 10°C, alors que la majorité des autres espèces de la section *Fumigati* le peuvent (Sugui et al., 2014a).

Aspergillus lentulus

La sporulation sur CZD (*Czapek-Dox agar*) et MEA (*malt extract agar*) est très lente. L'espèce croît difficilement à 45°C et ne croît pas à 48°C. Les vésicules et phialides sont plus petites que celles d'*A. fumigatus*. L'apparence est floconneuse et blanchâtre, avec un verso jaunâtre sans pigment diffusible (Balajee et al., 2005b).

Aspergillus turcosus

Sur MEA, les colonies normalement plates sont gris-turquoise à gris-vert. Les têtes aspergillaires sont courtes et les parois sont lisses. Le verso des colonies est jaune-orange à gris-orange. Les vésicules sont en forme de flasque à globuleuse, avec des phialides aussi en forme de flasque sur les deux tiers de la surface de la vésicule. Les conidies sont sous-globuleuses, ovoïdes et lisses. L'espèce croît entre 10 et 50°C. Avant la présente étude, *A. turcosus* n'avait été rapporté qu'une seule fois, ayant été isolé de systèmes d'air climatisé de maisons et de voitures à Séoul en Corée du Sud (Hong et al., 2008).

Aspergillus hiratsukae (*Neosartorya hiratsukae*)

Elle a été isolée de sols en Corée du sud (Hong et al., 2010), mais semble avoir une distribution mondiale. Les ascospores de la forme sexuée ont des surfaces convexes avec des réseaux fins et irréguliers (Hong et al., 2010).

Aspergillus thermomutatus (*Neosartorya pseudofischeri*)

L'espèce a aussi été isolée de sols en Corée du Sud (Hong et al., 2010). L'espèce croît de manière limitée à 48°C (Balajee et al., 2005a). La forme asexuée, *A. thermomutatus*, ressemble énormément à *A. lentulus*, puisque les deux espèces sporulent très lentement (Balajee et al., 2005a). La forme sexuée, *N. pseudofischeri*, produit des ascospores avec des rabats triangulaires sur surface convexe avec deux crêtes équatoriales (Hong et al., 2010; Hong et al., 2008). La formation des asques se caractérise par l'enroulement de plusieurs hyphes (Hong et al., 2008).

L'ornementation des ascospores est très distincte entre les espèces. *A. thermomutatus* a de petits rabats triangulaires sur le haut de la paroi de l'ascospore et est lisse au niveau équatorial. *A. fischeri* présente un motif plus réticulé qu'*A. thermomutatus*, comme *A. hiratsukae*. La différence entre *A. fischeri* et *A. hiratsukae* repose sur la morphologie coloniale sur CZD. Les isolats d'*A. fischeri* et d'*A. hiratsukae* croissent bien à 45°C (Jarv et al., 2004).

Identification moléculaire

Le séquençage des gènes ITS, ARNr 18S et ARNr 26S/28S ne permet pas de distinguer les espèces de la section *Fumigati*, à cause de leur proximité génétique. Pour ce faire, les gènes de la β -tubuline (*benA*), la calmoduline (*caM*), l'actine (*actA*) et l'hydrophobine (*rodA*) doivent être séquencés (Lamoth, 2016; Samson et al., 2007; Sugui et al., 2014a). Onze espèces d'*Aspergillus* section *Fumigati* peuvent être confondues avec *A. fumigatus* morphologiquement: *Aspergillus udagawae*, *Aspergillus thermomutatus*, *Aspergillus lentulus*, *Aspergillus felis*, *Aspergillus hiratsukae*, *Aspergillus fischeranus*, *Aspergillus viridinutans*, *Aspergillus novofumigatus* et *Aspergillus laciniosa* (Sugui et al., 2014a). Les gènes *btub*, *rodA* et *srg* d'*A. turcosus* ont 91% d'homologie à ceux d'*A. fumigatus* (Balajee et al., 2005b). Seul le séquençage de *benA* ou de *rodA* permet de distinguer *A. thermomutatus* d'*A. lentulus* (Balajee et al., 2005a)

Sensibilité aux antifongiques

Le profil de sensibilité aux antifongiques peut aussi permettre de différencier certaines espèces de la section *Fumigati*. Par exemple, *A. thermomutatus* et *A. udagawae* sont résistants au voriconazole et *A. lentulus* est résistant à l'amphotéricine B, l'itraconazole et le voriconazole, alors qu'*A. fumigatus* est habituellement sensible à tous ces antifongiques (Sugui et al., 2014a). L'espèce *A. hiratsukae* est sensible à tous les antifongiques, incluant l'amphotéricine B, l'itraconazole, le voriconazole, le ravuconazole, le posaconazole et la terbinafine (Hong et al., 2010). *A. thermomutatus* présente des CMI (concentration minimale inhibitrice) élevées à l'itraconazole, au voriconazole et au ravuconazole.

Prévalence

Seulement quelques études ont permis de quantifier la prévalence des espèces cryptiques de la section *Fumigati* parmi des souches cliniques, et celle-ci varie de 0,7 à 5,4% (Tableau I).

Tableau I: Prévalence d'isolats d'espèces cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati* dans la littérature.

Pays	Prévalence	Sélection	Référence
Brésil	1,4%	Aucune	(Negri et al., 2014)
Danemark	0,7%	Aucune	(Mortensen et al., 2011)
Espagne	3,7%	Aucune	(Alastruey-Izquierdo et al., 2013)
Espagne	5,2%	AI ou aspergillome	(Escribano et al., 2013)
États-Unis	5,4%	AI probable ou prouvée	(Balajee et al., 2009)
Portugal	3,4%	Aucune	(Sabino et al., 2014)
République Tchèque	3,4%	Aucune	(Hubka et al., 2012)
Autour du monde	0%	Aucune	(Etienne et al., 2009)

AI : aspergillose invasive

Facteurs de virulence/pathogénicité

Plusieurs espèces cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati* sont des pathogènes reconnus dans la littérature. En effet, l'espèce *A. lentulus* a déjà été décrite comme la cause d'une AI pulmonaire, alors que l'espèce *A. pseudofischeri* cause des endocardites, des kératites, des péritonites et des aspergilloses pulmonaires, résultant en des échecs thérapeutiques. De plus, *A. viridinutans* peut causer l'AI pulmonaire, alors que *A. udagawae* a été impliqué dans des cas d'AI pulmonaire et de kératites (Alastruey-Izquierdo et al., 2014).

A. hiratsukae est lié à plusieurs infections fongiques invasives chez l'homme et a été isolé de la peau, d'exsudat oropharyngé, de cornée et de liquide péritonéal. Il a également été identifié

comme l'agent responsable de rhinosinusite fongique allergique et d'aspergillose cérébrale (Alastruey-Izquierdo et al., 2014; Alcazar-Fuoli et al., 2008; Guarro et al., 2002), ainsi que d'un cas d'infection chez un hérisson (Han et Na, 2008).

A. thermomutatus a été isolé dans plusieurs cas d'aspergillose invasive chez l'humain, impliquant divers organes tels que l'os, la peau, le cerveau, le poumon et le foie (Alcazar-Fuoli et al., 2008; Araujo et al., 2012; Jarv et al., 2004; Padhye et al., 1994).

2. Aspergillose

Il existe un vaste spectre de formes cliniques d'aspergillose, qui sont largement dépendantes du statut immunitaire de l'hôte (Figure 5). Ces différentes formes ont une gravité très variable, allant d'une colonisation complètement asymptomatique, dans laquelle l'*Aspergillus* adopte un rôle purement saprophytique, à une atteinte souvent fatale dans l'aspergillose invasive.

2.1. Formes cliniques de l'aspergillose

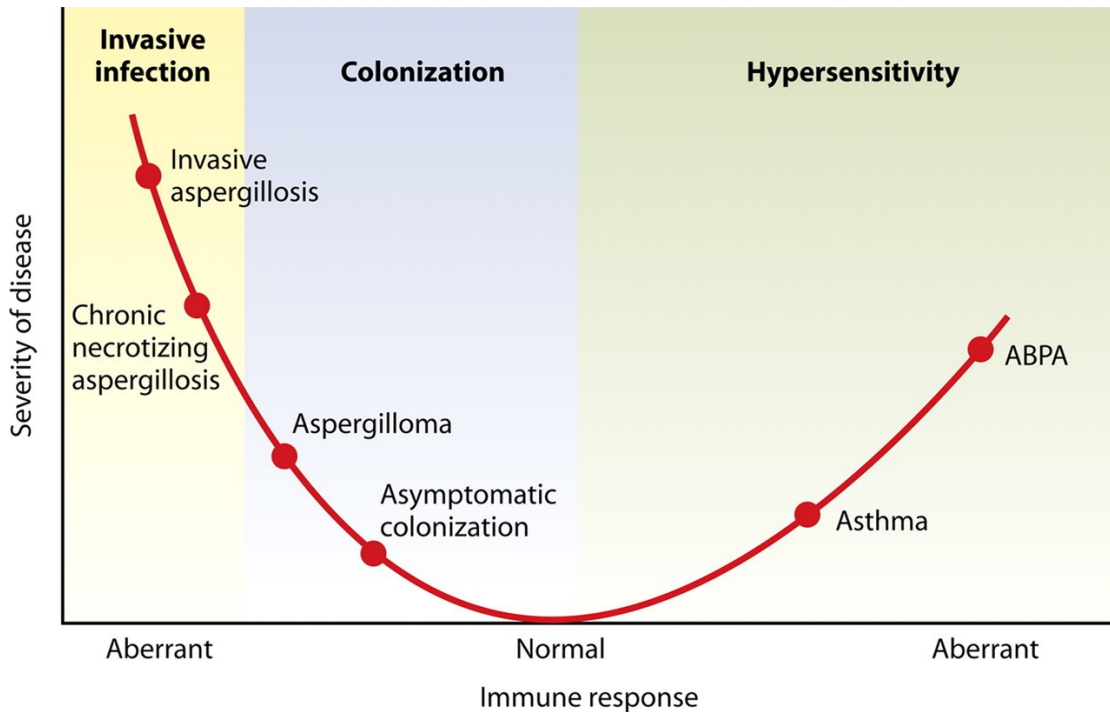


Figure 5. Formes cliniques de l'aspergillose en fonction de la réponse immunitaire. Figure tirée de (Park et Mehrad, 2009) avec autorisation.

Aspergillome

Cette forme est caractérisée par la croissance d'une « boule d'hyphes » à l'intérieur d'une cavité préexistante. Cette cavité pulmonaire préexistante peut être une lésion cicatricielle causée par une tuberculose, une sarcoïdose ou autres troubles pulmonaires. Des sinus paranasaux chroniquement obstrués constituent aussi des cavités propices au développement d'un aspergillome. Le mycélium se développe dans la cavité riche en protéines et une sporulation *in vivo* peut survenir en périphérie de la cavité. Cette condition est habituellement asymptomatique, mais elle peut se présenter par des hémoptysies, causées par l'érosion de vaisseaux sanguins adjacents. Rarement, le saignement peut résulter en une hémorragie fatale.

Cette forme clinique se rencontre habituellement chez des hôtes immunocompétents (Cadena et al., 2016; Latge, 1999).

Aspergillose pulmonaire cavitaire chronique (APCC)

Ce type d'aspergillose est qualifié de semi-invasif, puisque dans certains cas, il peut y avoir une invasion directe, bien que limitée, du parenchyme pulmonaire et une progression des dommages tissulaires. Les signes cardinaux de cette forme sont des lésions pulmonaires cavitaires, des symptômes respiratoires et systémiques chroniques et la présence dans le sérum d'anticorps précipitants contre *Aspergillus* (Cadena et al., 2016).

Aspergillose Bronchopulmonaire Allergique (ABPA)

L'ABPA se produit surtout chez les patients souffrant d'asthme atopique ou de fibrose kystique. Ce syndrome se caractérise par une réponse immunitaire produite par les cellules T, sans phénomène de tolérance. Ceci entraîne une réponse immunitaire exagérée qui est responsable de dommages chez l'hôte. Cette réaction d'hypersensibilité est caractérisée par une activation immunitaire chronique, des infiltrats pulmonaires et d'autres manifestations cliniques similaires à l'asthme (Cadena et al., 2016). Les patients non traités voient une progression vers une fibrose pulmonaire qui peut parfois mener à une insuffisance respiratoire terminale (Latge, 1999).

Aspergillose invasive (AI)

Dans un effort de standardisation de la recherche clinique et épidémiologique portant sur l'AI, le diagnostic de cette condition a fait l'objet d'un consensus international, publié pour la première fois en 2002 (Ascioglu et al., 2002) et mis à jour en 2008 (De Pauw et al., 2008). En

fonction de critères cliniques et microbiologiques précis, le degré de certitude du diagnostic est catégorisé comme « possible », « probable » ou « prouvée ». Le diagnostic d'IFI possible est posé si les facteurs prédisposants de l'hôte concordent avec ceux reconnus (comportant un historique de neutropénie, la présence d'une greffe allogénique, une utilisation prolongée de corticostéroïdes, une utilisation d'autres suppresseurs des cellules T ou une immunodéficience sévère innée) et s'il y a présence d'évidences cliniques compatibles, même en l'absence de preuve mycologique (un effort raisonnable pour éliminer d'autres étiologies infectieuses doit avoir été déployé). Le diagnostic d'IFI probable nécessite des facteurs de l'hôte reconnus, des évidences cliniques et mycologiques (incluant une culture positive d'un site non stérile ou la détection du galactomannane aspergillaire dans le sérum ou le lavage broncho-alvéolaire). (De Pauw et al., 2008). Le diagnostic d'IFI prouvée est posé lorsqu'un examen microscopique d'une biopsie a permis l'observation d'éléments fongiques et d'évidences de dommages tissulaires (histopathologie), ou si une culture d'un site normalement stérile (e.g. liquide céphalo-rachidien, sang) montre la croissance d'une espèce fongique (De Pauw et al., 2008).

L'AI est une cause importante de mortalité chez les patients atteints de néoplasies hématologiques et les patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques. L'incidence est sous-estimée due à la faible sensibilité des outils diagnostiques. Elle se produit rarement chez l'hôte immunocompétent (Latge, 1999). Il existe quatre types d'AI basés sur le site anatomique atteint:

- (i) Aspergillose invasive pulmonaire (la plus commune) ;
- (ii) Trachéobronchite (presqu'exclusivement au niveau de l'anastomose bronchique chez les greffés pulmonaires);

- (iii) Rhinosinusite invasive;
- (iv) Aspergillose disséminée, pouvant impliquer virtuellement n'importe quel organe en plus des poumons, mais principalement le cerveau, les yeux, le cœur et la paroi thoracique.

2.2. Épidémiologie clinique de l'AI

Les espèces les plus fréquemment isolées lors d'infections fongiques invasives sont les *Aspergillus* de la section *Fumigati*. On note aussi une augmentation constante de l'aspergillose à l'échelle mondiale. Il se produit environ 200 000 cas d'AI par année mondialement, avec un taux de mortalité de 30 à 95% (Brown et al., 2012). Au Canada seulement, 3000 cas d'IFI se produisent annuellement, dont 19% sont des AI (Dufresne et al., 2017). Le principal facteur de risque de l'AI est l'immunosuppression, principalement la neutropénie profonde et prolongée. Près de 50% des patients atteints ont une leucémie myéloïde aiguë, une leucémie lymphoïde aiguë ou ont reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques. Les patients greffés des poumons ou du cœur sont également à risque d'AI. De plus, une incidence croissante, de 6,1 à 57 par 1000 admissions, a été observée chez les patients hospitalisés dans les unités de soins intensifs (Lass-Florl et Cuenca-Estrella, 2017). Les polymorphismes géniques affectant la réponse innée du système immunitaire, chez les gènes codant le TLR4, IL-1B, β -défensine1, long Pentraxin-3 et Dectin-1, augmentent le risque de développer une AI chez les patients transplantés. La granulomatose septique chronique, qui se caractérise par un défaut de production de radicaux libres dérivés de l'oxygène par les neutrophiles, est un déficit immunitaire primaire (héréditaire) qui prédispose aussi à l'AI. En plus des facteurs de l'hôte, plusieurs facteurs environnementaux jouent un rôle dans l'incidence, tels que la présence d'un

site de construction à proximité (Lass-Florl et Cuenca-Estrella, 2017). La prophylaxie au posaconazole a diminué l'incidence de l'AI de 15,5% à 7% chez les patients en hématologie (Lass-Florl et Cuenca-Estrella, 2017).

2.3. Diagnostic

Méthodes de détection

Microscopie

Tout site infecté peut faire l'objet d'un examen microscopique à la recherche d'éléments fongiques. Les échantillons respiratoires et les biopsies sont les plus souvent utilisés. Le blanc de calcofluor est la coloration de prédilection pour les fungi, puisqu'elle lie la chitine de la paroi fongique. Cette coloration est utilisée sur les échantillons cliniques frais. Plusieurs autres colorations sont utilisées sur du tissu fixé et paraffiné, incluant le Gomori-Grocott et le Periodic Acid-Schiff. L'examen microscopique des échantillons cliniques permet de visualiser des hyphes septés à embranchement étroit, ce qui met en évidence une infection invasive à champignon filamentueux (hyalohyphomycose), mais ne permet pas d'établir qu'il s'agit spécifiquement d'une aspergillose. La microscopie est une méthode relativement rapide, mais elle manque de sensibilité et de précision.

Culture

Il est possible de cultiver *Aspergillus* à partir de différents échantillons cliniques. Plusieurs milieux de culture peuvent être utilisés, le plus fréquent étant la gélose Sabouraud dextrose. La plupart des espèces du genre *Aspergillus* poussent rapidement, typiquement en moins de 5 jours. Cette méthode diagnostique est relativement peu sensible, mais demeure une composante

importante du diagnostic, car l'isolement de l'agent étiologique en culture permet d'identifier l'espèce avec précision et de procéder à des épreuves de sensibilité (antifongigramme), afin de mieux orienter le traitement.

Anticorps

Les patients immunosupprimés ont une faible production d'anticorps anti-*A. fumigatus*, même lors d'une AI. À la suite de l'immunosuppression, le titre d'anticorps augmente, si le patient est en guérison d'une AI. La détection des anticorps permet donc un pronostic et non un diagnostic (Latge, 1999). La détection d'anticorps anti-*Aspergillus* est également utile pour le diagnostic des formes chroniques d'aspergillose survenant chez les patients immunocompétents (aspergillome, ABPA, APCC; voir section **2.1. Formes cliniques de l'aspergillose**).

Polysaccharides circulants

Deux antigènes sont recherchés pour établir le diagnostic de l'AI. Le galactomannane, un composant immunogénique de la paroi du champignon, a été le premier antigène découvert et est couramment utilisé pour la détection de l'AI. Le 1-3- β -D-glucane, un autre polysaccharide de la paroi, non-immunogénique, est également détectable dans l'AI (Cadena et al., 2016; Latge, 1999). Un ELISA en format sandwich est plus sensible pour la détection des antigènes fongiques, comparativement aux méthodes précédentes. L'ELISA permet aussi, dans certains cas, de détecter le galactomannane avant l'apparition des symptômes. Il permet aussi de mesurer le niveau d'antigènes et d'objectiver la réponse au traitement antifongique (Latge, 1999). Les essais pour la détection de 1,3- β -D-glucane et de galactomannane présentent de relativement bonnes caractéristiques de performance (sensibilité et spécificité) et sont inclus dans les définitions standard internationales des infections fongiques invasives (European Organisation

for Research and Treatment of Cancer / Mycosis Study Group) (De Pauw et al., 2008). De plus, des trousse commerciales sont approuvées pour l'usage clinique par Santé Canada et la FDA. La détection du galactomannane est présentement la méthode diagnostique la plus répandue en clinique.

Détection des acides nucléiques

Des méthodes utilisant le PCR pour détecter l'ADN d'*A. fumigatus* existent, mais sont moins utilisées, faute de standardisation (Cadena et al., 2016).

Identification

Lorsqu'un *Aspergillus* est retrouvé en culture, il peut être identifié grâce à ses caractéristiques macroscopiques et microscopiques. Macroscopiquement, la vitesse de croissance du thalle, sa couleur, ainsi que la vitesse de sporulation, sont les caractéristiques les plus discriminantes. Les principales caractéristiques observées en microscopie sont la forme, la taille et la couleur des têtes aspergillaires, la présence de cellules de Hülle et la taille des conidies (Sugui et al., 2014a). La thermotolérance est une autre caractéristique phénotypique utile pour l'identification. Pour une identification plus précise, il faut cependant requérir au séquençage de l'ADN génomique de certains gènes. En effet, le gène codant la bêta-tubuline (*benA*) est le plus restrictif, permettant une identification rapide et précise de la plupart des espèces d'*Aspergillus* section *Fumigati* (voir sous-section « Identification moléculaire » de la section 1.3). D'autres méthodes moléculaires ont également été décrites pour faciliter l'identification. Par exemple, une technique de PCR-RFLP (*polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism*) a été validée chez 285 *A. fumigatus*, 37 *A. lentulus*, 17 *A. udagawae* et 3 *A. thermomutatus* (souche ou séquence), assurant l'identification précise de ces espèces (Staab et

al., 2009). Cette méthode tire profit du fait que le gène *benA*, lorsque clivé par l'enzyme de restriction *BccI*, produit des fragments de tailles spécifiques à certaines des espèces du complexe (Balajee et al., 2006).

Tests de sensibilité aux antifongiques

Deux techniques approuvées d'antifongigramme existent dans le monde. En Europe, la méthode de l'EUCAST (*European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*) est utilisée, alors qu'en Amérique, c'est celle du CLSI (*Clinical & Laboratory Standards Institute*), qui fait office de référence.

L'antifongigramme du CLSI consiste à déposer une suspension normalisée de conidies dans les puits d'une microplaque de 96 puits, contenant des concentrations ascendantes d'antifongiques, ainsi qu'un puit sans antifongique comme témoin positif de croissance. Cette méthode permet d'établir la concentration minimale à laquelle la croissance du fungus testé est significativement réduite, soit la concentration minimale inhibitrice (CMI). Pour les échinocandines (casposungine, micafungine et anidulafungine), la morphologie des hyphes est perturbée à des concentrations inférieures à celles réduisant la croissance. La concentration d'antifongique à partir de laquelle les hyphes sont déformés est appelée concentration minimale effectrice (CME). Pour cette classe d'antifongique, la CME corrèle davantage avec la réponse *in vivo* (CLSI et Wayne, 2008).

2.4. Traitements

Antifongiques (classes, mécanismes d'action, spectre d'action)

L'amphotéricine B est un antifongique polyène fongicide, qui lie l'ergostérol présent dans la membrane des champignons, perturbe la membrane et produit une fuite des composantes internes de la cellule, causant la mort cellulaire (Cadena et al., 2016). L'amphotéricine B agit sur plusieurs espèces de champignons. Cet antifongique a une plus grande affinité pour l'ergostérol fongique que le cholestérol humain, mais la sélectivité faible induit une toxicité potentielle, entre autres de la néphrotoxicité. Les formulations lipidiques de l'amphotéricine B ont une toxicité réduite, en partie à cause du délai de distribution de l'amphotéricine B vers les reins (Odds et al., 2003).

La classe des azolés regroupe les imidazolés et les triazolés. Les azolés inhibent la 14 α -déméthylation du lanostérol, dans la voie de biosynthèse de l'ergostérol, en ciblant la protéine qui catalyse cette déméthylation, soit le cytochrome P450-Erg11p (nommée Cyp51A chez *A. fumigatus*). La protéine contient une protoporphyrine et un atome de fer localisés au site actif, et l'antifongique azolé se lie à l'atome de fer par un atome d'azote situé dans l'anneau imidazolé ou triazolé. Les antifongiques triazolés ont remplacé les imidazolés afin d'augmenter la spécificité à l'égard du P450 fongique par rapport au P450 humain. La déplétion d'ergostérol dans la membrane altère la perméabilité et la fluidité de celle-ci, causant un effet surtout fongistatique (Odds et al., 2003), bien que le voriconazole présente des caractéristiques fongicides contre *Aspergillus* (Krishnan et al., 2005).

De nouveaux dérivés triazolés possèdent des structures différentes, modifiant le spectre d'activité, la biodisponibilité, les interactions médicamenteuses, et la toxicité. Le voriconazole,

le premier triazolé de seconde génération, est actif chez une plus grande étendue d'espèces fongiques, et s'avère fongicide chez certaines espèces filamenteuses (Cadena et al., 2016). Bien qu'il interagît avec plusieurs autres médicaments (Odds et al., 2003), il est plus efficace que l'amphotéricine B (Cadena et al., 2016). Le posaconazole est semblable au voriconazole et possède également un spectre d'activité étendu (Odds et al., 2003), et une structure semblable à l'itraconazole (Cadena et al., 2016). Il est utilisé en prophylaxie chez les patients à risque d'IFI (ie. *Graft-vs-Host Disease* ou leucémie myéloïde), mais il est métabolisé par le foie et peut interagir avec le P450 3A4 humain (Cadena et al., 2016). L'itraconazole est utilisé contre les formes non-invasives ou chroniques d'aspergillose (Cadena et al., 2016).

Les allylamines et morpholamines sont représentées par la terbinafine et l'amorolfine, respectivement. La terbinafine inhibe la squalène époxidase, une enzyme impliquée dans la biosynthèse de l'ergostérol, et est efficace contre plusieurs champignons filamenteux, mais peu de levures. L'amorolfine vise également des enzymes de la biosynthèse de l'ergostérol, Erg24p et Erg2p, mais ne peut être utilisée que comme traitement topique (Odds et al., 2003).

Les échinocandines sont caractérisées par un cycle hexapeptidique avec des chaînes latérales lipidiques. Les prototypes d'origine naturelle, l'échinocandine B (par la suite modifiée en cilofungine) et l'aculeacin A, ont été abandonnées à cause de leur toxicité. Dans les années 1990, des dérivés semi-synthétiques, la caspofungine, l'anidulafungine et la micafungine ont été développés, ciblant les glucane synthases responsables de la biosynthèse des polysaccharides 1,3- β -D-glucane de la paroi cellulaire (Cadena et al., 2016; Odds et al., 2003). Elles ont plutôt un effet fongistatique que fongicide (Cadena et al., 2016) contre les champignons filamenteux. Les échinocandines utilisées en clinique se distinguent par leur profil d'innocuité très favorable.

Leur cible est complètement absente chez l'humain et elles sont donc généralement très bien tolérées.

Lignes directrices cliniques

Les triazolés sont actuellement les principaux agents utilisés pour le traitement et la prévention de l'AI.

Une étude menée de 1997 à 2000, sur 277 patients atteints d'AI prouvée ou probable et avec un système immunitaire compromis, a démontré qu'après 12 semaines de traitement avec le voriconazole, 52,8% des patients montraient une réponse et le taux de survie était de 70,8%, alors que le groupe témoin, traité à l'amphotéricine B, montrait une réponse chez 31,6% des patients et un taux de survie de 57,9% (Herbrecht et al., 2002). Ces résultats ont établi le voriconazole comme le premier choix pour le traitement de l'AI.

Deux études randomisées-contrôlées ont comparé le posaconazole aux plus vieux triazolés (fluconazole ou itraconazole) pour la prévention de l'AI chez des patients à haut risque, soit des patients atteints de leucémie aiguë en traitement de chimiothérapie d'induction de rémission et des patients ayant reçu une greffe de cellules souches hématopoïétiques avec maladie du greffon contre l'hôte (Cornely et al., 2007; Ullmann et al., 2007). Ces deux études ont démontré la supériorité du posaconazole, qui est maintenant considéré comme le premier choix pour la prophylaxie anti-*Aspergillus* dans ces populations.

3. Résistance aux triazolés

Denning et al. (1997) a été l'un des premiers à découvrir la présence de résistance d'*A. fumigatus* aux triazolés. À la suite de l'identification de trois isolats cliniques résistants à

l'itraconazole, plusieurs hypothèses de mécanismes de résistance ont été proposées. L'altération de la voie de biosynthèse de l'ergostérol pourrait produire une résistance aux triazolés. En effet, une modification de l'affinité de Cyp51A à l'endroit des triazolés (Figure 5, élément 1) ou une surexpression de *cyp51a* (Figure 5, élément 2) pourraient expliquer la résistance. D'autre part, la faible concentration de l'antifongique dans les cellules de champignons soulève la possibilité d'une implication des pompes à efflux (Figure 5, élément 3). Enfin, deux autres hypothèses, sans preuves jusqu'à présent, consisteraient en la production d'enzymes dégradant l'antifongique (Figure 5, élément 4) ou de l'expression d'une voie de contournement (Figure 5, élément 5) (Hagiwara et al., 2016b).

Dans une étude publiée en 2015 (Abdolrasouli et al., 2015), 24 isolats d'*A. fumigatus* ont été séquencés par WGS (*whole genome sequencing*). Dix-huit de ces isolats avaient des CMI's dépassant les ECVs (*epidemiological cutoff values*, valeurs de seuil épidémiologique), soit ≥ 2 $\mu\text{g/ml}$. La souche AF293, séquencée à nouveau dans cette étude, présentait 73 SNPs (*single nucleotide polymorphism*, polymorphisme d'un simple nucléotide) par rapport à la séquence publiée, pouvant résulter du repiquage répété de cette souche, ou d'une erreur de séquençage. De plus, plusieurs isolats contenaient des délétions de plusieurs centaines de paires de bases sur au moins un chromosome. Les 17 isolats avec des CMI's plus grandes que 4 $\mu\text{g/ml}$ contenaient la double mutation TR34/L98H de *cyp51a*, bien que plusieurs autres mutations étaient également présentes chez les souches sensibles et résistantes aux triazolés. Une ressemblance marquée entre les souches provenant de l'Inde a été observée. La mutation TR34/L98H de *cyp51a* semble se développer dans plusieurs conditions cliniques et environnementales différentes (Abdolrasouli et al., 2015).

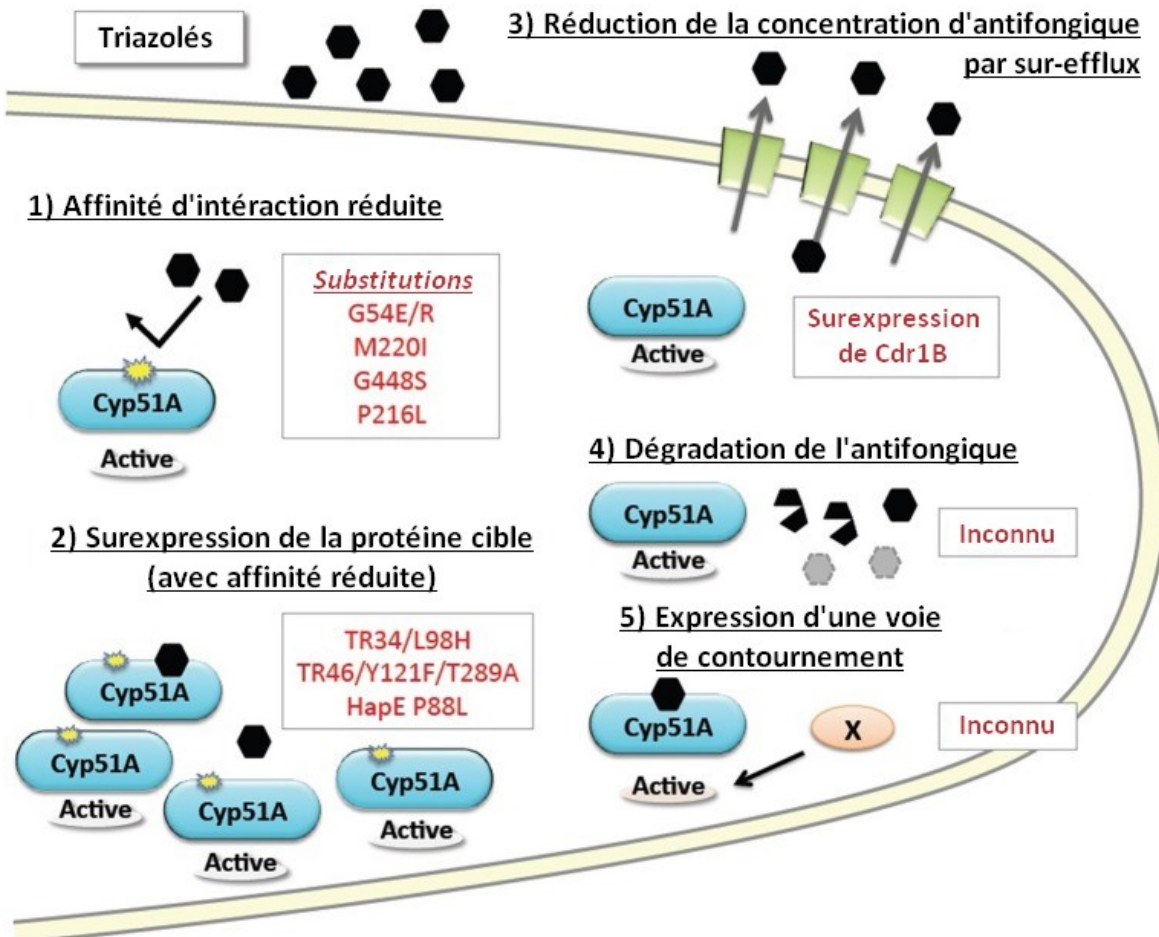


Figure 5. Mécanismes de résistance aux triazolés connus ou hypothétiques chez *Aspergillus fumigatus*. Figure 5 adaptée de (Hagiwara et al., 2016b) avec autorisation.

3.1. Mécanismes

Cyp51A (14 α -déméthylase; P450)

Deux gènes de P450 ont été découverts chez les champignons filamenteux, tout d'abord chez *A. fumigatus*, qui sont *cyp51a* et *cyp51b*. D'une longueur de 2048 pb et 2239 pb, respectivement, chez *A. fumigatus*, chaque gène possède un intron, de 71 pb pour *cyp51a* et 58 pb pour *cyp51b*. Les protéines résultantes sont de 515 et 524 acides aminés, respectivement pour *cyp51a* et *cyp51b* (Mellado et al., 2001).

Une double altération du gène codant la Cyp51A confère la résistance aux triazolés. En effet, une répétition en tandem de 34 pb dans le promoteur, accompagnée d'une substitution L98H dans la protéine, rend les souches résistantes à plusieurs triazolés. Il a aussi été démontré que ces deux altérations sont nécessaires, mais non suffisantes, pour conférer la résistance. En effet, la répétition de 34 pb augmente le niveau d'expression du gène, alors que la substitution diminue l'affinité aux triazolés (Mellado et al., 2007). Des souches présentant cette répétition en tandem, ainsi qu'une autre (TR46) dans le promoteur du gène *cyp51a*, sont très répandues chez des patients sans historique de traitement aux antifongiques triazolés, et dans l'environnement. Il a été démontré que ces mutations sont induites par l'utilisation d'antifongiques azolés dans l'environnement. La répétition en tandem a pour effet d'augmenter l'expression du gène *cyp51a*, mais ne peut induire la résistance à elle seule. Une ou plusieurs mutations dans le gène (L98H, Y121F/T289A) doivent être aussi présentes chez les souches résistantes aux triazolés (Hagiwara et al., 2016b). En effet, la quantité d'ARNm du gène *cyp51a* est 3,8 fois plus élevée en présence de la double mutation, qu'en l'absence de celle-ci (Paul et al., 2017). Le gène *cyp51B* est peut-être aussi impliqué dans la résistance aux triazolés, mais la relation n'est pas encore claire (Hagiwara et al., 2016b).

Facteurs de transcription

Les niveaux d'ARNm de *cyp51a* sont 4 à 6 fois plus élevés chez les souches expérimentales d'*A. fumigatus* contenant la substitution P88L dans la sous-unité HapE du facteur de transcription Hap, composé des sous-unités HapB, HapC et HapE (Camps et al., 2012). Cette sous-unité lie la séquence CCAAT du promoteur de *cyp51a* et le complexe agit

comme répresseur. La substitution P88L rend résistante aux triazolés une souche d'*A. fumigatus* initialement sensible, en éliminant cette répression (Gsaller et al., 2016).

Le facteur de transcription AtrR (type Zn₂-Cys₆) régule plusieurs gènes impliqués dans la biosynthèse de l'ergostérol (*cyp51a*, *erg24A*, *erg24B*, *erg25A*, *hyd1*), ainsi que le transporteur *cdr1B* de type ABC (*ATP-binding cassette*). En effet, en absence de ce régulateur, les niveaux d'expression baissent drastiquement et les souches mutées sont moins virulentes et survivent moins bien en hypoxie (Hagiwara et al., 2017).

Pompes à efflux et diminution de l'accumulation des triazolés

Le gène *atrF*, codant le transporteur ABC AtrF, est présent en une seule copie dans le génome d'*A. fumigatus*. Cependant, plusieurs autres séquences dans le génome démontrent une forte identité, suggérant des gènes ayant une fonction semblable. En présence d'itraconazole, la souche résistante montre un taux d'expression d'ARNm d'*atrF* cinq fois plus élevé, qu'en absence d'itraconazole. Par contre, une souche sensible montre un faible niveau d'expression, tant en présence qu'en absence d'itraconazole (Slaven et al., 2002). Donc, chez les souches résistantes, la transcription du transporteur est induite en présence d'itraconazole.

En présence d'un inhibiteur de pompes à efflux (IPE), les CMI à l'égard des triazolés de plusieurs souches résistantes à l'itraconazole sont rétablies à un phénotype sensible. Ainsi, deux nouvelles pompes à efflux, *Afumdr3* et *Afumdr4*, ont été découvertes et s'avèrent surexprimées chez plusieurs mutants résistants d'*A. fumigatus*. La pompe *Afumdr3* est une MFS (*major facilitator superfamily*; superfamille majeure de facilitateurs), alors qu'*Afumdr4* est une ABC. La surexpression de ces pompes est soit constitutive ou activée en présence d'itraconazole *in*

vitro (Nascimento et al., 2003). Les pompes à efflux *Afumdr3*, *Afumdr4* et *atrR* sont donc fort probablement impliquées dans la résistance à l'itraconazole (da Silva Ferreira et al., 2004).

Le gène *cdr1B*, aussi connu sous les désignations *abcC* et *abcG1*, code pour une pompe à efflux de type ABC qui, lorsque surexprimée, diminue la sensibilité aux antifongiques triazolés. De plus, des souches sensibles démontrent une hyper-sensibilité aux triazolés en absence de ce gène. De la même manière, des souches $\Delta atrR$, $\Delta atrI$ (transporteurs ABC) ou $\Delta MdrA$ (transporteur MFS) démontrent une sensibilité accrue aux triazolés (Hagiwara et al., 2016b).

Faisant suite à ces découvertes, il a été démontré que *cdr1B* est nécessaire au phénotype de résistance des souches avec la double mutation TR34/L98H du gène *cyp51a*. En effet, quand ce gène codant un transporteur ABC est inactivé, la CMI d'*A. fumigatus* à l'égard des triazolés est réduite à un phénotype sensible (Paul et al., 2017).

3.2. Épidémiologie de la résistance

La double mutation de la protéine Cyp51A et de son promoteur, TR34/L98H, a été décrite tout d'abord aux Pays-Bas (Snelders et al., 2008; van der Linden et al., 2011a), puis en Chine (Lockhart et al., 2011), en Inde (Chowdhary et al., 2012), en Iran (Badali et al., 2013), au Kuwait (Ahmad et al., 2014), au Danemark (Astvad et al., 2014), en Turquie (Ozmerdiven et al., 2015), aux États-Unis (Wiederhold et al., 2016), en Tanzanie (Mushi et al., 2016), en Colombie (Alvarez-Moreno et al., 2017) et enfin au Japon (Onishi et al., 2017; Toyotome et al., 2017). La triple mutation de la même protéine et de son promoteur, TR46/Y121F/T289A, a aussi été retrouvée dans un grand nombre de pays d'Europe, d'Asie et d'Amérique du Nord (Alvarez-Moreno et al., 2017; Astvad et al., 2014; Chen et al., 2015; Chowdhary et al., 2014; Hagiwara

et al., 2016a; Montesinos et al., 2014; Pelaez et al., 2015; Vermeulen et al., 2012; Wiederhold et al., 2016).

Puisque ce genre de mutation, comportant une répétition en tandem dans le promoteur jumelée à une substitution d'acide aminé dans la protéine, a été démontré comme pouvant être induite par l'exposition aux antifongiques utilisés en agriculture, la possibilité que des souches résistantes se développent dans l'environnement de pays où de telles mutations n'ont pas encore été détectées est très élevée et justifie donc une surveillance épidémiologique (Ahmad et al., 2014; Snelders et al., 2009).

4. Génomique

En 2005, le séquençage du génome haploïde de la souche d'*A. fumigatus* AF293 a été complété, résultant en huit chromosomes comportant 29,4 Mb au total, regroupant 9840 gènes, dont 9353 (95%) ont une fonction inconnue (Cerqueira et al., 2014).

Parmi les informations ainsi générées, notons particulièrement la présence de 323 gènes qui sont surexprimés à 48°C, comparativement à 37°C (Nierman et al., 2005). Ces gènes seraient donc potentiellement impliqués dans la thermotolérance d'*A. fumigatus*. De plus, 58 gènes codant pour des allergènes ont été découverts (Nierman et al., 2005). En 2016, deux souches isolées de la Station Spatiale Internationale (SSI) ont été séquencées à des fins de comparaison avec les souches terrestres (Singh et al., 2016). Aucune différence morphologique, génétique ou physiologique n'a été observée *in vitro* entre les deux souches de la SSI et les souches de référence séquencées, AF293 et CEA10, à l'exception d'une résistance accrue aux rayons U.V. D'un autre côté, les souches isolées de la SSI étaient significativement plus virulentes et léthales

in vivo, que les souches de référence (Knox et al., 2016), dans un modèle de larve de poisson-zèbre neutropénique.

Hypothèses et objectifs

Nous formulons l'hypothèse que la prévalence d'espèces cryptiques *d'Aspergillus* dans une collection de souches isolées à Montréal serait faible (environ 5%) et constituée d'espèces cryptiques répandues mondialement. Les mécanismes de résistance à l'égard des antifongiques triazolés de ces souches cryptiques seront reliés à des mutations de *cyp51a*, et à la surexpression de pompes à efflux.

Les objectifs spécifiques de ce projet étaient de :

- i. Déterminer la prévalence des espèces cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati*;
- ii. Déterminer la prévalence de la résistance au triazolés parmi les *Aspergillus* section *Fumigati*;
- iii. Déterminer la signification clinique des espèces cryptiques et des *Aspergillus fumigatus* résistants aux triazolés;
- iv. Élucider les mécanismes de résistance de ces isolats :
 - a. Identifier les mutations du gène *cyp51a*;
 - b. Déterminer l'implication des pompes à efflux dans le phénomène de résistance.

Matériel et méthodes

Collection d'isolats cliniques d'*Aspergillus*

L'Hôpital Maisonneuve-Rosemont, affilié à l'Université de Montréal, prend en charge des patients à risque d'aspergillose, incluant les receveurs de greffe rénale et de moelle osseuse, les patients souffrant de néoplasies hématologiques et les patients atteints de maladie pulmonaire obstructive chronique. À partir de l'an 2000, tous les isolats provenant de n'importe quel type d'échantillon clinique et identifiés par morphotypage comme *A. fumigatus* au laboratoire de mycologie clinique de l'hôpital ont été conservés dans le glycérol à 15%, à -80°C. Dans cette étude rétrospective, tous les isolats conservés de 2000 à 2013 ont été inclus. Les isolats ont été décongelés et cultivés sur milieu SDA (Sabouraud dextrose agar; Oxoid, Hants, UK) à 37°C pour 48 à 72h, puis repiqués sur un nouveau milieu et incubés à l'identique. Après croissance, les organismes viables ont été identifiés de nouveau par morphotypage (apparence macroscopique des colonies et apparence microscopique des têtes aspergillaires), et les souches compatibles avec le complexe *A. fumigatus* (section *Fumigati*) ont été retenues pour l'étude.

Souches contrôles et séquences de référence

Une souche contrôle sensible aux triazolés (*A. fumigatus* ATCC® MYA 3627) et deux résistantes (*A. flavus* ATCC® 204304 and *A. calidoustus* LSPQ-01356) ont été incluses dans la méthode de dépistage de résistance aux triazolés par MDL (microdilution en milieu liquide). La séquence du gène *cyp51a* des souches références sensibles aux triazolés d'*A. fumigatus* CM237 et AF293 (Alastruey-Izquierdo et al., 2014; Alcazar-Fuoli et al., 2011) et résistantes aux triazolés d'*A. lentulus* CM1290 et IFM54703T (Kusuya et al., 2016; Mellado et al., 2011) ont été utilisées pour l'alignement des séquences d'acides aminés de Cyp51A des souches

séquencées dans cette étude. Puisque les génomes des souches *d'A. fumigatus* AF293 et *d'A. lentulus* IFM54703T sont entièrement séquencés, elles ont aussi été utilisées pour l'alignement d'AtrR, de HapE et pour comparer les gènes de pompes à efflux et les autres gènes métaboliques. La souche de référence *d'A. fumigatus* ATCC® MYA 3627 et les souches résistantes aux triazolés, et surexprimant les gènes de pompes à efflux, F17727, F18304 et F20140 (Fraczek et al., 2013) (généreusement offerts par le Dr. David Denning, University of Manchester, United Kingdom), ont été utilisées comme souches contrôles dans l'essai d'IPE (inhibiteur de pompes à efflux). Les souches sensibles aux triazolés *d'A. fumigatus* AF293 et ATCC® MYA 3627, ainsi que la souche résistante F20140, ont été utilisées comme contrôles dans l'essai de Nile red des pompes à efflux.

Récolte des conidies

Les conidies ont été récoltées à partir de cultures fraîches sporulées provenant du second repiquage de la suspension dans 15% glycérol, incubé 48-72h sur SDA à 35°C, en inondant la gélose en Pétri d'une solution de PBS + 0,05% TWEEN 80. Les suspensions de conidies ont été ajustées à une densité équivalente à un MacFarland 0,5 (équivalent à $0.4 \text{ à } 5 \times 10^4$ UFC/ml) et entreposées à 4°C jusqu'à la prochaine utilisation. Pour les tests de sensibilité aux antifongiques, les conidies fraîches étaient utilisées immédiatement.

Dépistage phénotypique des espèces *Fumigati* cryptiques

Comme il aurait été extrêmement long et coûteux de procéder à l'identification moléculaire de tous les isolats, un algorithme en deux étapes a été développé. Un dépistage phénotypique a d'abord été réalisé sur l'ensemble des isolats *d'A. fumigatus* (tels qu'identifiés présomptivement par morphotypage). Le dépistage phénotypique consistait à tester pour la

thermotolérance et la vitesse de sporulation. Un inoculum standard (50 µl de la suspension de conidies à MacFarland 0,5) de chaque isolat a été inoculé sur SDA et incubé à 37°C et 49°C, parallèlement, durant 72h. Les isolats qui démontraient (i) une absence de croissance ou une croissance restreinte à 49°C ou (ii) qui n'étaient pas complètement couvertes de conidies vertes (témoignant d'une sporulation lente) à 37°C, étaient considérés atypiques et potentiellement une espèce cryptique. Dans une deuxième étape, ces isolats ont fait l'objet d'une identification basée sur la séquence génomique (voir plus bas). Des isolats considérés comme typiques par la méthode de dépistage ont aussi été soumis aléatoirement à une identification moléculaire, afin de valider la sensibilité et la spécificité du dépistage.

Dépistage de la résistance aux triazolés

Comme il aurait été extrêmement long et coûteux de procéder à un antifongigramme standard pour tous les isolats, un algorithme en deux étapes a été développé. Un test de dépistage de résistance aux trois principaux triazolés a été développé, permettant de tester 21 isolats par microplaque de 96 puits. Le dépistage de la résistance aux triazolés a été effectué pour tous les isolats non cryptiques d'*A. fumigatus*. La méthode de dépistage a été adaptée de la méthode standardisée du CLSI M38-A2 (CLSI et Wayne, 2008). La souche contrôle sensible aux triazolés (*A. fumigatus* ATCC® MYA 3627) et les deux résistantes (*A. flavus* ATCC® 204304 and *A. calidoustus* LSPQ-01356) ont été utilisées sur chacune des plaques (Figure 6). Un inoculum standard de conidies (suspension de conidies équivalent au MacFarland 0,5, dilué 1:50) a été ajouté à trois puits d'une plaque à 96 puits à fonds ronds, contenant de l'itraconazole, du voriconazole et du posaconazole, respectivement, à des concentrations finales fixes équivalentes aux valeurs seuil de sensibilité pour *A. fumigatus* (1 mg/L pour itraconazole et

voriconazole; 0.5 mg/L pour posaconazole; Espinel-Ingroff et al., 2010) . Du RPMI-1640 tamponné a été utilisé comme milieu de culture et un puits sans triazolé a été inclus comme contrôle positif de croissance. Les microplaques ont été incubées durant 48h à 35°C et examinées avec un miroir inversé. Les isolats avec une croissance visible dans n'importe quel puits contenant un triazolé étaient considérés potentiellement résistants. Dans une deuxième étape, ces isolats ont fait l'objet d'un antifongigramme standard (voir plus bas). Des isolats considérés comme sensibles par la méthode de dépistage ont aussi été soumis aléatoirement à un antifongigramme complet, afin de valider la sensibilité et la spécificité du dépistage.

	None	ITR	VOR	POS	None	ITR	VOR	POS	None	ITR	VOR	POS
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Control 1 = susceptible strain											
B	Control 2 = resistant strain											
C	Control 3 = resistant strain											
D												
E												
F												
G												
H												

Figure 6. Distribution des souches et antifongiques dans une plaque de 96 puits pour le dépistage de la résistance aux triazolés. Les concentrations d'antifongiques sont de 1 mg/L pour itraconazole et voriconazole, et de 0.5 mg/L pour posaconazole. Les souches contrôles *A. fumigatus* ATCC® MYA 3627, *A. flavus* ATCC® 204304 et *A. calidoustus* LSPQ-01356 sont présentes sur chaque plaque. Donc 21 isolats non cryptiques d'*A. fumigatus* sont dépistés par plaque. ITR : itraconazole; VOR : voriconazole; POS : posaconazole.

Épreuve de sensibilité aux antifongiques de CLSI

Le test de sensibilité aux antifongiques standardisé a été réalisé à l'aide de la méthode de MDL du CLSI M38-A2 (CLSI et Wayne, 2008), chez i) tous les isolats d'espèces cryptiques

d'*Aspergillus* section *Fumigati*, ii) tous les isolats potentiellement résistants aux triazolés déterminés par le dépistage, et iii) une sélection au hasard d'isolats d'*A. fumigatus stricto sensu*, dépistés comme sensibles aux trois triazolés. Chaque antifongique est préparé au double de la concentration la plus élevée présente dans la plaque (Figure 7). Des dilutions en série de log 2 sont effectuées avant que 50 µl soit déposé dans la plaque. 50 µl d'un inoculum standard de 0.4×10^4 à 5.0×10^4 CFU/ml de l'isolat à tester est ensuite déposé dans chaque puits, de manière à diluer l'antifongique de moitié et d'atteindre la concentration désirée. Après 24 heures d'incubation à 35°C, les CMEs pour l'anidulafungine, la caspofungine, et la micafungine sont prises en note, soit la concentration la plus faible à laquelle un changement qualitatif dans la croissance est observé. Après 48 heures d'incubation, les CMI s ont été déterminées pour l'amphotéricine B, le fluconazole, l'itraconazole, le posaconazole et le voriconazole, soit la plus faible concentration à laquelle 100% de la croissance est inhibée. Les isolats d'espèces cryptiques et d'*A. fumigatus stricto sensu* démontrant des CMI s aux triazolés dépassant les ECVs pour *A. fumigatus* (Espinel-Ingroff et al., 2010) étaient considérés résistants, peu importe l'espèce. La CME seuil de >1 µg/ml suggérée par la méthode de référence du CLSI M38-A2 a été utilisée pour déterminer la résistance aux échinocandines anidulafungine, caspofungine et micafungine (CLSI et Wayne, 2008).

ANTIFONGIGRAMME (µg/ml)													
Puits		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	Ampho B.	Tém.	0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16
B	Anidulafungine	Tém.	0,008	0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
C	Casposfungine	Tém.	0,008	0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
D	Fluconazole	Tém.	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128
E	Itraconazole	Tém.	0,016	0,032	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16
F	Micafungine	Tém.	0,008	0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8
G	Posaconazole	Tém.	0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16
H	Voriconazole	Tém.	0,016	0,03	0,06	0,12	0,25	0,5	1	2	4	8	16

Figure 7. Configuration d'une plaque d'antifongigramme complet selon la méthode M38-A2 du CLSI. Ampho B. : Amphotéricine B; Tém. : Témoin sans antifongique.

Examen des dossiers médicaux

Après approbation du projet par le comité d'éthique de l'hôpital Maisonneuve-Rosemont, les dossiers médicaux des patients à l'origine d'un isolat cryptique et/ou résistant aux triazolés d'*Aspergillus* section *Fumigati* ont été révisés pour obtenir les données démographiques et cliniques. Les maladies associées aux *Aspergillus* ont été classifiées selon les définitions courantes dans la littérature (Hope et al., 2005), et selon les définitions de l'aspergillose invasive du *European Organisation for Research and Treatment of Cancer/ Mycoses Study Group* (De Pauw et al., 2008).

Essai du Nile red pour les pompes à efflux

Nous avons adapté une méthode de Nile red en microplaque (Tsao et al., 2016), afin de la rendre compatible aux exigences techniques d'un champignon filamentueux. Le Nile red (9-diethylamino-5H-benzo- α -phenoxazine-5-one) est une molécule fortement fluorescente dans un environnement riche en lipides, tel que la membrane cellulaire (Greenspan et al., 1985). Il est

facilement expulsé des cellules par les pompes à efflux présentes dans la membrane, tel que précédemment démontré chez une souche de *Saccharomyces cerevisiae* exprimant des pompes à efflux de *Candida albicans* (Ivnitski-Steele et al., 2009).

Lecture par puits

Nous avons modifié la méthode développée par Tsao et al. (2016) pour les levures, afin de l'accommoder aux champignons filamenteux. En bref, $2,5 \times 10^8$ conidies ont été mises en suspension dans 250 ml de RPMI-1640, à 30°C durant 12 heures avec une agitation rotative à 250 rpm. Cette première étape avait pour but de laisser les conidies mûrir en conidies gonflées et en tubes germinatifs. Ces formes sont métaboliquement actives, alors que les conidies sont des cellules de résistance plutôt inertes. Les cellules ont ensuite été lavées 2 fois avec du PBS 1X. $1,5 \times 10^{10}$ cellules ont été mises en suspension dans 750 µl de PBS 1X + 1% glucose, en duplicata, et incubées à 30°C durant 1 heure avec agitation rotative à 250 rpm. Cette étape a hypothétiquement l'effet d'assurer une réserve d'énergie suffisante pour les cellules, plusieurs pompes d'efflux étant dépendantes d'énergie (utilisation d'ATP). Par la suite, le Nile red a été ajouté à une concentration finale de 6 µM (dans un seul des puits en duplicata) et une incubation de 10 minutes a été réalisée, afin de laisser s'installer un équilibre entre le Nile red intra- et extracellulaire. 200 µl des suspensions de cellules ont alors été transférées dans une plaque 96-puits noire, en triplicata, afin de mesurer la fluorescence émise. Les contrôles négatifs étaient du PBS 1X + 1% glucose avec 6 µM de Nile red. La valeur basale de référence utilisée était une suspension de cellules sans Nile red, en duplicata. Les plaques sont lues deux fois avec le lecteur de plaque FlexStation II, avec une longueur d'onde d'excitation à 553 nm et d'émission à 660 nm. De façon importante, le Nile Red n'est fluorescent que lorsqu'il est lié à des lipides

(Greenspan et al., 1985) et donc seul le Nile Red intracellulaire fluoresce. Par conséquent, la quantité de fluorescence émise par les cellules corrèle avec la quantité de Nile Red intracellulaire, laquelle est inversement proportionnelle à l'activité des pompes d'efflux.

Lecture par cellule

Étant donné que la méthode par puits manquait de reproductibilité (voir résultats), la méthode a été adaptée afin de mieux standardiser les cellules testées. Une méthode microscopique de mesure de la fluorescence dans les cellules individuelles a donc été développée. Il a d'abord fallu optimiser la production de tubes germinatifs.

Afin de déterminer les meilleures conditions de croissance des tubes germinatifs, plusieurs combinaisons d'inoculum, de milieu de croissance, de température et de temps d'incubation ont été explorées. Les inocula explorés ont été 10^4 , $3,25 \times 10^4$, 10^5 , 5×10^5 , 10^6 et 2×10^7 cellules par ml. Les milieux explorés ont été le Sabouraud liquide, le PBS 1X + 2%, 10% ou 20% de glucose, le RPMI-1640 et le RPMI-1640 + 10% FBS inactivé. Les températures testées ont été 30 et 37°C. Les temps d'incubations ont varié de 5 à 16 heures. Les essais ont été effectués la plupart du temps avec deux souches différentes en parallèle. À la suite des essais, nous avons décidé d'utiliser 10^5 cellules par ml, dans du RPMI-1640 + 10% FBS, incubé à 37°C durant 8 heures, pour le protocole final.

À la fin de la période de croissance des tubes germinatifs, le milieu de culture est centrifugé à 2500xg, le surnageant est jeté et du PBS est ajouté afin de remettre en suspension les tubes. Cette étape est répétée une seconde fois et le surnageant jeté. Les tubes sont à nouveau suspendus dans 4 ml de PBS + 1% glucose et incubées 1h à 37°C, avec 250 rpm d'agitation. Le Nile red est ajouté à une concentration finale de 6 μ M, et le tout est incubé à nouveau durant 30

min, puis transféré dans un FluoroDish™ à fond de verre (World Precision Instruments, Inc., Sarasota, FL). La suspension des tubes germinatifs est observée au microscope Nikon Eclipse Te2000U, en utilisant le filtre Texas Red (longueur d'ondes: excitation, 560/55; émission, 645/75). Des photos de sections longitudinales de tubes germinatifs entiers ont été prises à des intervalles de 1,5 μm , à un grossissement de 60X et après une exposition de 200 ms, à l'aide d'un filtre neutre ND8. Un total de 10 tubes germinatifs a été sélectionné au hasard pour chaque isolat. Environ 100 sections longitudinales par tube germinatif ont été photographiées, selon l'épaisseur du tube germinatif, résultant en environ 1000 photographies par isolat, qui sont considérées comme des mesures indépendantes. (Fiji Is Just) ImageJ 2.0.0-rc-54/1.51h (Schindelin et al., 2012; Schindelin et al., 2015) a été utilisé pour l'analyse de la fluorescence des images. Après la soustraction du bruit de fond, une intensité seuil est choisie pour éliminer la fluorescence non-spécifique, et la fluorescence des tubes germinatifs est mesurée et divisée par la surface de chaque section, afin d'obtenir des mesures standardisées et indépendantes de la dimension des tubes germinatifs. Seules les souches pour lesquelles nous avons des représentants sensible et résistant au sein de la même espèce ont été testées, afin de contrôler pour une possible variabilité interespèce.

Essai d'inhibition des pompes à efflux

Un essai en échiquier dans une microplaque à 96 puits, dérivé de la méthode MDL du CLSI M38-A2, a été développé afin de quantifier l'effet d'un inhibiteur de pompes à efflux sur la sensibilité au voriconazole des isolats cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati*. L'essai contient du voriconazole aux concentrations échelonnées de 0 à 64 $\mu\text{g/ml}$, en duplicata, et l'IPE à large spectre CM-207,110 (1-Phe-1-Arg- β -naphthylamide) (Rajendran et al., 2011), aux

concentrations de 0, 32, 64 et 128 µg/ml. Après une incubation à 35°C durant 48h, les CMI_s au voriconazole ont été déterminées à chaque concentration d'IPE.

Extraction d'ADN génomique

L'ADN a été extrait du mycélium d'une culture fraîche, issue de la suspension de conidies dans 15% glycérol, en utilisant la trousse ZR Fungal/Bacterial DNA MiniPrep (Zymo Research Corp., Irvine, CA), selon la méthode proposée par le manufacturier. L'ADN extrait a été conservé à 4°C pour identification par séquence de la bêta-tubuline et séquençage génomique des isolats sélectionnés.

Identification par séquençage génique

Tous les isolats atypiques d'*A. fumigatus* et quelques isolats typiques sélectionnés au hasard ont été identifiés par séquençage du gène de la bêta-tubuline (*benA*). Le gène *benA* a été amplifié par PCR et séquencé tel que décrit auparavant (Balajee et al., 2005b), avec les amorces BTUB1 et BTUB2 (Tableau II). Les amplicons ont été envoyés à Génome Québec pour séquençage par la méthode Sanger et les séquences résultantes ont été comparées aux séquences disponibles sur GenBank par BLAST. Pour confirmer l'identification des espèces cryptiques, les gènes d'ITS et de calmoduline (*caM*) ont aussi été séquencés par le Laboratoire de Santé Publique du Québec.

Amplification PCR du gène *cyp51a* d'*A. lentulus*

Le gène *cyp51a* d'*A. lentulus* HMR AF 1185 a dû être amplifié par PCR standard, puisque cet isolat ne faisait pas partie du WGS. Heureusement, l'amplification du gène dans cette espèce a déjà été effectué (Mellado et al., 2001) et la séquence est donc connue. Puisque le gène est de

1616 pb, il a été amplifié en trois fragments se chevauchant, pour faciliter l'optimisation du PCR. Les amorces utilisées (Tableau II) ont amplifié un fragment de 882 pb, un deuxième de 942 pb, ainsi qu'un troisième de 1020 pb. Les trois fragments ont été amplifiés en utilisant l'ADN polymérase haute-fidélité *KOD Hot Start* de Novagen (EMD Millipore, Billerica, MA), ainsi qu'un programme de 2 min à 95°C et 40 cycles de 95°C durant 20 s, 54°C durant 10 s et 70°C durant 50 s. Les produits PCR résultants ont été conservés à 4°C jusqu'au séquençage.

Les amplicons ont été séquencés par la méthode Sanger chez Génome Québec (<http://www.genomequebec.com/>), à l'aide des amorces utilisées pour l'amplification et des amorces de séquençage Cyp51a-PCR-MPM-F1, Cyp51a-PCR-MPM-F2, Cyp51a-PCR-MPM-R1, Cyp51a-PCR-MPM-R2, Cyp51a-PCR-MPM-R3 et Cyp51a-PCR-MPM-R4 développés par notre laboratoire (Tableau II).

Tableau II : Amorces utilisées pour l'amplification et le séquençage des gènes à l'étude.

Gène	Orientation (Nom d'amorce)	Séquence (5' à 3')	Références
<i>benA</i>	Sens (BTUB1)	AATTGGTGCCGCTTTCTGG	(Balajee et al., 2005b)
	Antisens (BTUB2)	AGTTGTCGGGACGGAATAG	(Balajee et al., 2005b)
<i>cyp51a</i> (amplification fragment 882 pb)	Sens (P-A7)	TCATATGTTGCTCAGCGG	(Mellado et al., 2001)
	Antisens (AL-cyp51a-seq-R2)	ACCACGTCAGATCC®GAAAAC	Cette étude
<i>cyp51a</i> (amplification fragment 942 pb)	Sens (AL-cyp51a-seq-F1)	GGGGTGCATTGCTGAGTATT	Cette étude
	Antisens (AL-cyp51a-seq-R4)	CGCATGAGCGAGTGAATAGA	Cette étude
<i>cyp51a</i> (amplification fragment 1020 pb)	Sens (AL-cyp51a-seq-F4)	ACAACCACAGGTCTTGGAAG	Cette étude
	Antisens (AL-cyp51a-R6)	TCGCTGCTACGTTTTGGATG	Cette étude
<i>cyp51a</i> (séquençage fragment 882 pb)	Sens (P-A7)	TCATATGTTGCTCAGCGG	(Mellado et al., 2001)
	Sens (AL-cyp51a-F6)	AGTTCCTCATGCGTCTTCT	Cette étude
	Antisens (AL-cyp51a-R7)	CGACAGGGAGAAGAAGGACA	Cette étude
<i>cyp51a</i> (séquençage fragment 942 pb)	Antisens (AL-cyp51a-seq-R2)	ACCACGTCAGATCCGAAAAC	Cette étude
	Sens (AL-cyp51a-seq-F1)	GGGGTGCATTGCTGAGTATT	Cette étude
	Sens (AL-cyp51a-seq-F2)	GTGGATATCTGCGCAAT	Cette étude
	Antisens (AL-cyp51a-seq-R3)	GTCAAGACGACGCTGATTGA	Cette étude
	Antisens (AL-cyp51a-seq-R4)	CGCATGAGCGAGTGAATAGA	Cette étude
<i>cyp51a</i> (séquençage fragment 1020pb)	Sens (AL-cyp51a-seq-F4)	ACAACCACAGGTCTTGGAAG	Cette étude
	Sens (AL-cyp51a-F7)	TCTTCTCAGGGCCCATGAAG	Cette étude
	Antisens (AL-cyp51a-seq-R5)	CACAATGGTCGCCAGAATTA	Cette étude
	Antisens (AL-cyp51a-R6)	TCGCTGCTACGTTTTGGATG	Cette étude

Séquençage complet du génome

Cinq isolats ont fait l'objet d'un WGS (*whole genome sequencing*; séquençage du génome complet), soit un *A. turcosus* résistant aux triazolés et un sensible (sélectionné au hasard), un *A. thermomutatus* résistant aux triazolés, et l'*A. fumigatus* résistant aux triazolés et un sensible (sélectionné au hasard). Les bibliothèques des génomes de tous les isolats ont été préparées avec

Nextera XT (Illumina Inc., CA). Le séquençage a été effectué sur le système de séquençage MiSeq (Illumina Inc., CA) en utilisant la trousse V3 600 cycles de MiSeq.

Identification des gènes métaboliques et de pompes à efflux

BLAST a été utilisé pour identifier les gènes de pompes à efflux et les gènes métaboliques impliqués dans la résistance aux triazolés, à partir des séquences génomiques déterminées dans cette étude ou rapportées ailleurs (Kusuya et al., 2016). Les gènes précédemment rapportés chez la souche AF293 d'*A. fumigatus* (Fraczek et al., 2013; Liu et al., 2015; Losada et al., 2015; Mellado et al., 2001) ou chez la souche SC5314 de *C. albicans* (Kanafani et Perfect, 2008; Schubert et al., 2011; Tsao et al., 2009; Tsao et al., 2016) ont été utilisés comme référence. Le pourcentage d'identité a été calculé par BLAST (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Alignements d'AtrR, de HapE et de Cyp51A

Les séquences d'AtrR, de HapE et de Cyp51A des isolats WGS et des souches de référence dont le génome complet est disponible ont été récupérées en utilisant BLAST (NCBI, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Numéros d'accès

Le numéro d'accès de la séquence d'acides aminés de Cyp51A de la souche *A. fumigatus* CM237 est AAK73659 (Mellado et al., 2001). Celui de la souche d'*A. lentulus* CM1290 est GU479991 (Alcazar-Fuoli et al., 2011). Les numéros d'accès pour les génomes complets des souches *A. fumigatus* AF293 et *A. lentulus* IFM54703T sont ASM265v1 (Nierman et al., 2005) et BCLY01000001 à BCLY01000019 (Kusuya et al., 2016), respectivement.

Logiciels informatiques

Le logiciel FastQC (<http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) a été utilisé pour un filtrage qualitatif et quantitatif des *reads* résultants du séquençage complet des génomes. Les contigs ont été formés par l'assemblage des *reads* avec le logiciel Spades version 3.7.0 (Nurk et al., 2013), pour les isolats d'*A. fumigatus* et d'*A. thermomutatus*, et avec le logiciel Ray version 2.3.1 (Boisvert et al., 2010; Boisvert et al., 2012), pour les isolats d'*A. turcosus*. Un script python maison (du Laboratoire de Santé Publique du Québec) a permis de filtrer les assemblages (garder les contigs avec plus de 5x de couverture et plus long que 500 pb). Une même séquence a été amplifiée et séquencée un minimum de cinq fois, ce qui certifie chaque paire de base. Un contrôle final a été réalisé à l'aide du logiciel de visualisation QUAST 4.1 (Gurevich et al., 2013). La prédiction des gènes et l'annotation des isolats qui ont subi le WGS ont été effectuées en utilisant le pipeline funannotate (<https://github.com/nextgenusfs/funannotate>), contenant les prédictions d'*A. fumigatus* pour AUGUSTUS. Chromas version 2.6 (<https://technelysium.com.au/wp/chromas/>) a été utilisé pour éditer les chromatogrammes et assembler les séquences des fragments du *cyp51a* d'*A. lentulus*. MEGA7 version 7.0.21 (Kumar et al., 2016) a été utilisé pour aligner les séquences d'acides aminés des protéines AtrR, HapE et Cyp51A. BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html>) a permis la production des images d'alignements.

Résultats

Identification polyphasique des isolats cliniques

De 2000 à 2013, 1182 isolats cliniques ont été identifiés comme *A. fumigatus* dans le laboratoire de diagnostic de l'Hôpital Maisonneuve-Rosemont à Montréal (Figure 11). Après une première croissance, 184 des isolats ont été exclus de l'étude, pour cause de perte de viabilité, de mauvaise identification, indisponibilité de l'échantillon ou de contamination, laissant 998 isolats disponibles présomptifs d'*A. fumigatus*. De plus, deux isolats de cette même période (un *A. lentulus* et un *A. hiratsukae*), déjà identifiés comme tels au Laboratoire de Santé Publique du Québec, ont été ajoutés, pour un total de 1000 isolats (Figure 11).

Parmi les 998 isolats compatibles avec *A. fumigatus* par morphotypage soumis au dépistage phénotypique, 28 ont été désignés comme des cryptiques probables (Figure 8). En effet, 23 de ces isolats avaient une croissance lente ou une sporulation lente (colonies blanches) à 37°C, alors que 5 ne poussaient pas à 49°C. Un de ces isolats a perdu sa viabilité au cours des expériences.

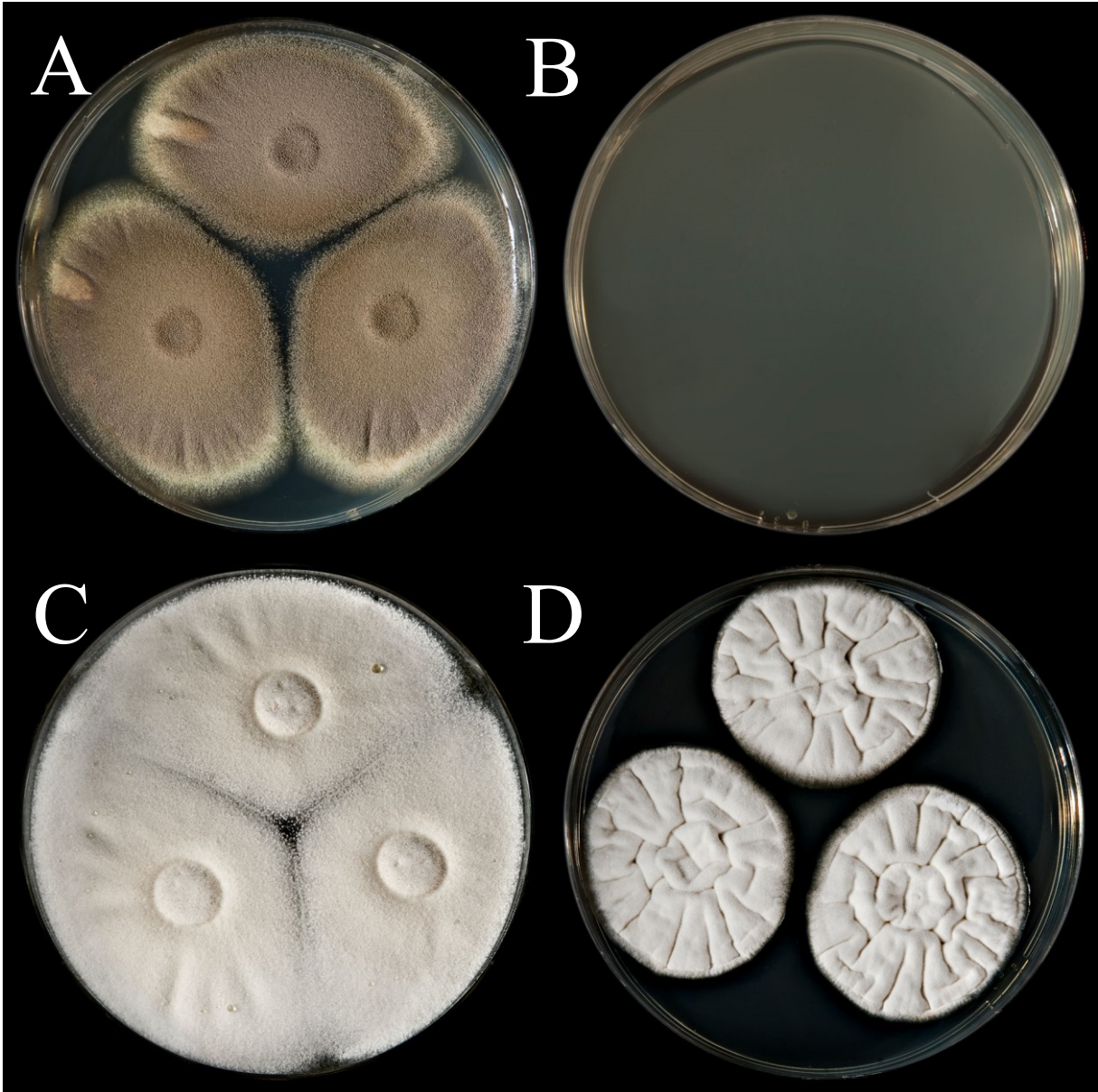


Figure 8 : Exemple de croissance et de thermotolérance de souches cryptiques d'*Aspergillus* probables. *Aspergillus turcosus* HMR AF 23 à 37°C (A) et 49°C (B), *Aspergillus thermomutatus* HMR AF 37 à 37°C (C) et *Neosartorya hiratsukae* HMR AF 832 aussi à 37°C (D). Une croissance réduite ou d'une autre couleur que verte est considéré cryptique probable, de même qu'une absence de croissance à 49°C.

Grâce à l'amplification et au séquençage du gène de la bêta-tubuline (*benA*; Figure 9), quatorze des 28 isolats définis comme cryptiques probables ont été bel et bien identifiés comme des espèces cryptiques: *A. lentulus* (n=1), *A. hiratsukae* (n=2), *A. turcosus* (n=4) et *A. thermomutatus* (n=7) (Figure 10). La révision des dossiers médicaux a révélé que les sept isolats d'*A. thermomutatus* provenaient d'un seul patient. Tous les 82 isolats séquencés, qui n'étaient pas soupçonnés d'être des espèces cryptiques, ont été bel et bien confirmé comme des *A. fumigatus*, confirmant la validité de notre méthode de dépistage. Globalement, la prévalence d'isolats d'espèces cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati* est de 1,4% (14/999).

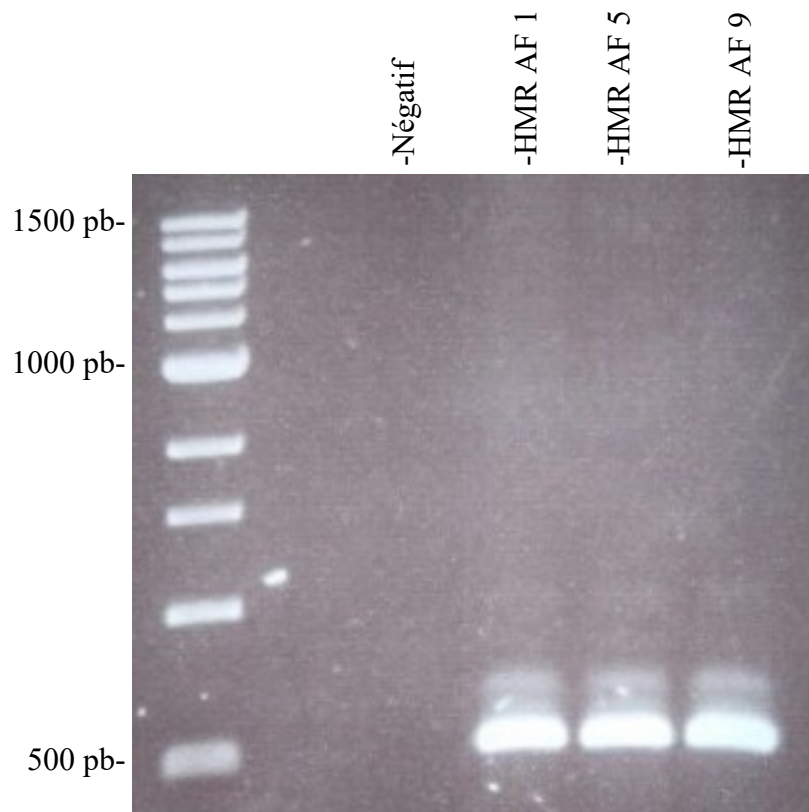


Figure 9. Exemple de résultat d'amplification PCR du gène *benA* des isolats d'*A. fumigatus* à l'étude.

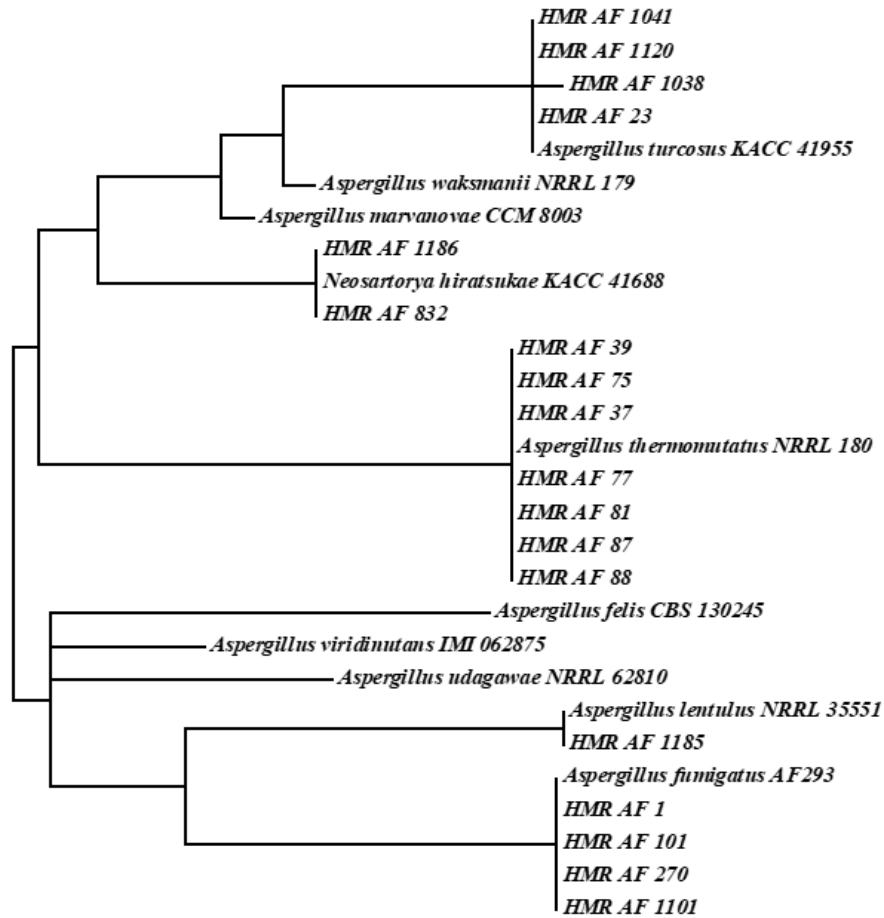


Figure 10. Arbre phylogénétique des séquences de *benA* des isolats suspectés d’être cryptiques et des souches de référence. Analyse phylogénétique produite par la méthode de Maximum Likelihood. Les souches débutantes par « HMR AF » sont des souches de l’étude.

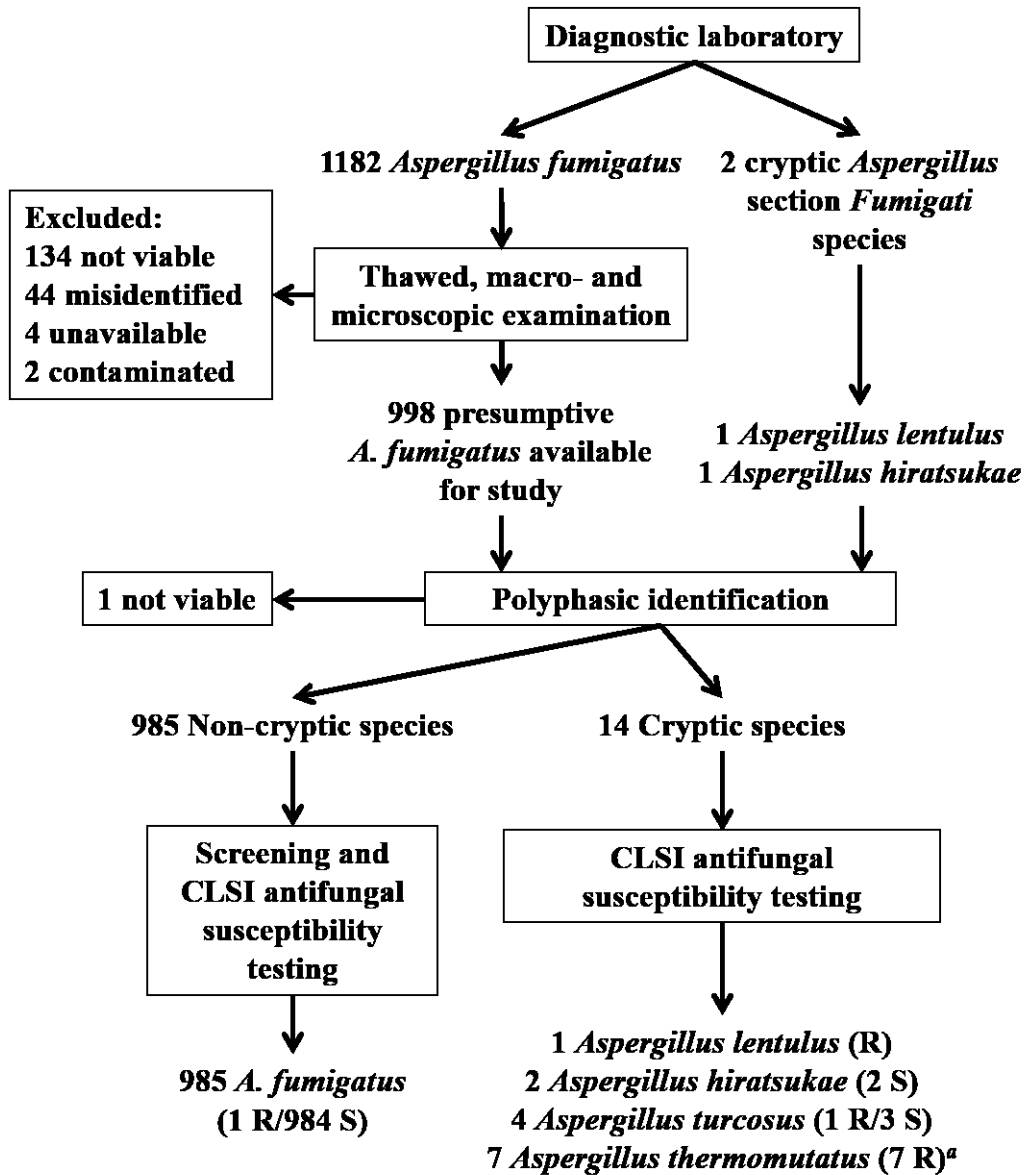


Figure 11. Algorithme d'identification et de test de sensibilité des 1184 isolats d'*Aspergillus* section *Fumigati*. Les nombres entre parenthèses représentent le profil de sensibilité des isolats à n'importe quel triazolé (S, sensible; R, résistant). ^a Les sept isolats d'*A. thermomutatus* ont été prélevés chez un seul patient.

Test de sensibilité aux antifongiques

Le dépistage de la résistance aux antifongiques effectué sur tous les isolats qui n'étaient pas des cryptiques, basé sur nos critères de résistances précédemment définis (>1 mg/L pour itraconazole et voriconazole; >0.5 mg/L pour posaconazole; Espinel-Ingroff et al., 2010), a révélé que trois isolats d'*A. fumigatus* étaient potentiellement résistants à l'itraconazole et neuf au voriconazole.

Le test de sensibilité aux antifongiques standard du CLSI (version complète; Figure 12) a été effectué sur ces isolats potentiellement résistants (n=12), tous les isolats cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati* (n=14), ainsi que sur une sélection prise au hasard d'*A. fumigatus* typiques et sensibles aux triazolés (n=32).

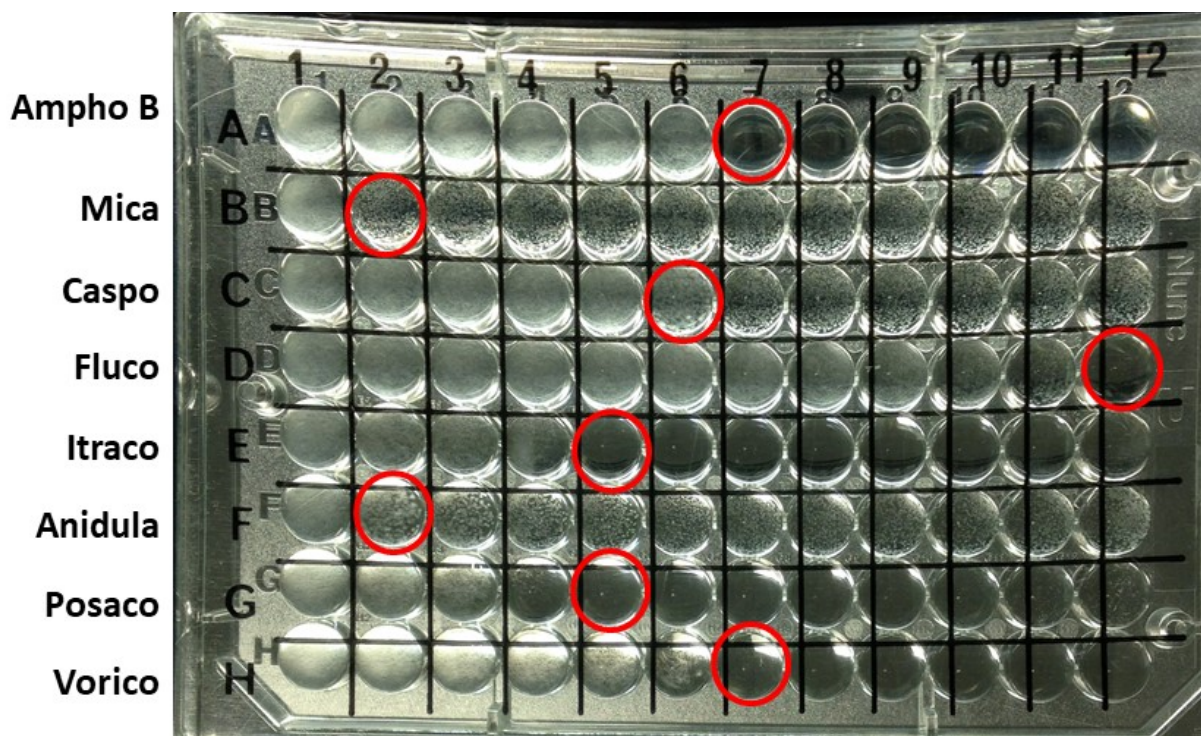


Figure 12. Exemple de résultat d'un antifongigramme complet selon méthode M38-A2 du CLSI (CLSI et Wayne, 2008). Résultat de la souche contrôle *Aspergillus flavus* ATCC® 204304. La colonne 1 ne contient aucun antifongique, alors que les colonnes 2 à 12 comportent une quantité croissante (log 2) d'antifongique (Figure 7). Les triazolés (fluconazole, itraconazole, posaconazole et voriconazole) et l'amphotéricine B sont lus à la plus petite concentration où il y a 100% d'inhibition de la croissance. Les échinocandines (micafungine, caspofungine et anidulafungine) sont lus à la plus faible concentration où la croissance est anormale, comparativement au témoin dans antibiotique. Les cercles rouges démontrent la valeur de CMI ou CME résultante. Ampho B : amphotéricine B; Mica : micafungine; Caspo : caspofungine; Fluco : fluconazole; Itraco: itraconazole; Anidula : anidulafungine, Posaco : posaconazole; Vorico : voriconazole.

Un seul isolat d'*A. fumigatus* (HMR AF 270) et un d'*A. turcosus* (HMR AF 1038) ont été confirmés comme résistants à l'itraconazole, au posaconazole et au voriconazole, alors qu'un autre d'*A. turcosus* (HMR AF 23) a été confirmé résistant à l'amphotéricine B. Les sept isolats d'*A. thermomutatus* (représentés par HMR AF 39) sont résistants à l'itraconazole, au posaconazole et au voriconazole et l'isolat d'*A. lentulus* (HMR AF 1185) a été confirmé résistant à l'amphotéricine B, à l'itraconazole et au voriconazole (Tableau III). Tous les isolats testés étaient sensibles à l'anidulafungine, à la caspofungine et à la micafungine (MECs <1 µg/ml), et résistants au fluconazole (MICs >64 µg/ml), à l'exception d'un *A. turcosus* qui était sensible au fluconazole (MIC =8 µg/ml). Les 32 isolats sensibles par la méthode de dépistage et sélectionnés aléatoirement pour un antifongogramme standard se sont tous révélés sensibles par cette dernière méthode, confirmant la validité du dépistage.

En général, malgré que seulement 1,0% de tous les isolats d'*Aspergillus* section *Fumigati* étaient résistants aux triazolés (10/999), la prévalence de la résistance aux triazolés était notablement élevée chez les isolats d'espèces cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati* (9/14; 64%), comparé aux *A. fumigatus* stricto sensu (1/985; 0,1%). En effet, chez trois des huit patients associés à une espèce cryptique, un isolat résistant aux triazolés a été isolé (Tableau III).

Tableau III. Maladies sous-jacentes et conditions associées à *Aspergillus* des patients avec un isolat d'espèces cryptique d'*Aspergillus* section *Fumigati* sensible ou résistant aux triazolés et de l'isolat résistant aux triazolés d'*A. fumigatus*.

Patient	Sexe /Âge	Comorbidités	Condition clinique associé à <i>Aspergillus</i>	Spécimen	Date de collecte (aaaa-mm-jj)	Isolat	Identification par β -tubuline	CMI ($\mu\text{g/ml}$)				
								AMB	FLC	ITC	PSC	VRC
1	H/62	LLC; MPOC; Pneumonie acquise dans la communauté	Colonisation	LBA	2000-05-23	HMR AF 23	<i>A. turcosus</i>	2	8	0.25	0.12	0.25
2	H/52	TCSH	Aspergillose des sinus non-invasif et abcès du septum nasal	Abcès du sinus nasal	2000-07-31	HMR AF 39	<i>A. thermomutatus</i>	2	>256	2	1	2
3	H/55	Cavité d'un probable épisode de TB	APCC	Expectoration	2002-12-18	HMR AF 270	<i>A. fumigatus</i>	1	>256	2	1	2
4	F/70	Lymphome (cutané); MPOC	APCC	LBA	2009-06-26	HMR AF 832	<i>A. hiratsukae</i>	2	128	0.25	0.12	1
5	H/51	MPOC; SAHS; EABC	Colonisation	LBA	2010-10-14	HMR AF 1185	<i>A. lentulus</i>	4	>256	2	0.5	2
6	H/71	Insuffisance cardiaque congestive; SAHS; Hémoptysie idiopathique	Colonisation	LBA	2011-12-08	HMR AF 1186	<i>A. hiratsukae</i>	1	256	0.5	0.25	0.5
7	H/70	Diabète sucré; MPOC; Maladie pulmonaire par <i>M. avium</i>	Colonisation	LBA	2012-10-16	HMR AF 1038	<i>A. turcosus</i>	2	128	2	1	2
8	H/68	MPOC; EABC	Colonisation	Expectoration	2012-02-15	HMR AF 1041	<i>A. turcosus</i>	2	128	0.25	0.12	0.5
9	F/57	Transplantation d'un rein; PPC	Colonisation	LBA	2013-01-23	HMR AF 1120	<i>A. turcosus</i>	4	128	0.25	0.06	0.25

H, Homme; F, Femme; LLC, Leucémie Lymphoïde Chronique; MPOC, Maladie Pulmonaire Obstructive Chronique; TCSH, Transplantation de Cellules Souches Hématopoïétique; TB, Tuberculose; SAHS, Syndrome d'Apnée/Hypopnée du Sommeil; EABC, Exacerbation Aiguë de la Bronchite Chronique; PPC, Pneumonie par *Pneumocystis jirovecii*; APCC, Aspergillose Pulmonaire Cavitaire Chronique; Conditions en **GRAS** sont des maladies liées à *Aspergillus*; LBA, Lavage Bronchoalvéolaire; AMB, Amphotéricine B; FLC, Fluconazole; ITC, Itraconazole; PSC, Posaconazole; VRC, Voriconazole; Valeurs de CMI en **GRAS** indique résistance, basé sur (Espinel-Ingroff et al., 2010).

Constatations cliniques

Les sept isolats d'*A. thermomutatus* ont été prélevés chez le **Patient 2**, qui était le receveur d'une greffe de cellules souches hématopoïétiques (Tableau III). *A. thermomutatus* était la cause d'une aspergillose du sinus nasal et d'un abcès du septum nasal, qui ont régressé après un débridement chirurgical, combiné à un traitement à l'amphotéricine B et à l'itraconazole. Durant la greffe de cellules souches hématopoïétiques et avant l'aspergillose du sinus, le patient recevait du fluconazole en prophylaxie. Une guérison durable a été obtenue à l'aide d'un traitement combiné d'amphotéricine B et de caspofungine, mais le patient a par la suite succombé d'une pneumonie à *Staphylococcus aureus*.

Le **Patient 3** a reçu de la chimiothérapie et de la radiothérapie pour un cancer de la langue, sept ans avant l'infection, et était connu pour une cavité apicale pulmonaire compatible avec un épisode passé de tuberculose (Tableau III). Il a également souffert de maladie pulmonaire obstructive chronique. Il a consulté pour une toux chronique, une hémoptysie et une fièvre intermittente. Une tomodensitométrie pulmonaire a révélé plusieurs lésions cavitaires avec des infiltrations alvéolaires de l'apex droit. Le liquide broncho-alvéolaire et la biopsie pulmonaire transthoracique ont résulté en la croissance d'*A. fumigatus* sensible aux triazolés. Un diagnostic d'aspergillose pulmonaire cavitaire chronique a été posé, mais la maladie a progressé, malgré un traitement à l'itraconazole. Plus de deux ans après le diagnostic et 18 mois de traitement à l'itraconazole, une culture d'expectorations a produit un *A. fumigatus* résistant aux triazolés (isolat HMR AF 270). Le patient a déménagé dans une autre ville et a été perdu au suivi.

Le **Patient 4** a été traité avec des corticostéroïdes systémiques, et souffrait de maladie pulmonaire obstructive chronique (Tableau III). Les antécédents médicaux ont révélé des

séquelles granulomateuses pulmonaires, compatibles avec une ancienne histoplasmosse ou tuberculose. Des infiltrats nodulaires pulmonaires apicaux avec des cavités ont été découverts par tomodynamométrie d'un petit nodule pulmonaire déjà connu. *A. hiratsukae* a été isolé du liquide de LBA. Le diagnostic le plus probable était une aspergillose pulmonaire cavitaire chronique, mais le patient est décédé d'un infarctus du myocarde et n'a reçu aucun traitement antifongique.

Pour les six autres patients, les isolats d'*Aspergillus* section *Fumigati* étaient associés avec de la colonisation, et un diagnostic autre que l'aspergillose a été posé pour la maladie pulmonaire qui a incité une culture fongique (Tableau III).

Mécanismes de résistance

Essai du Nile red pour les pompes à efflux

Lecture par puits

Contrairement aux attentes initiales, les résultats de lecture du Nile red par plaque de 96 puits ont démontré une ambiguïté entre les souches résistantes aux triazolés surexprimant des pompes à efflux (Figure 13). En effet, les souches contrôles F18304 et F20140 ont un RFU (*relative fluorescent unit*; unité relative de fluorescence) inférieure à la souche sensible, alors que celui de la souche contrôle F17727 est plus élevée. Face à cette incongruité, nous avons passé à une autre méthode.

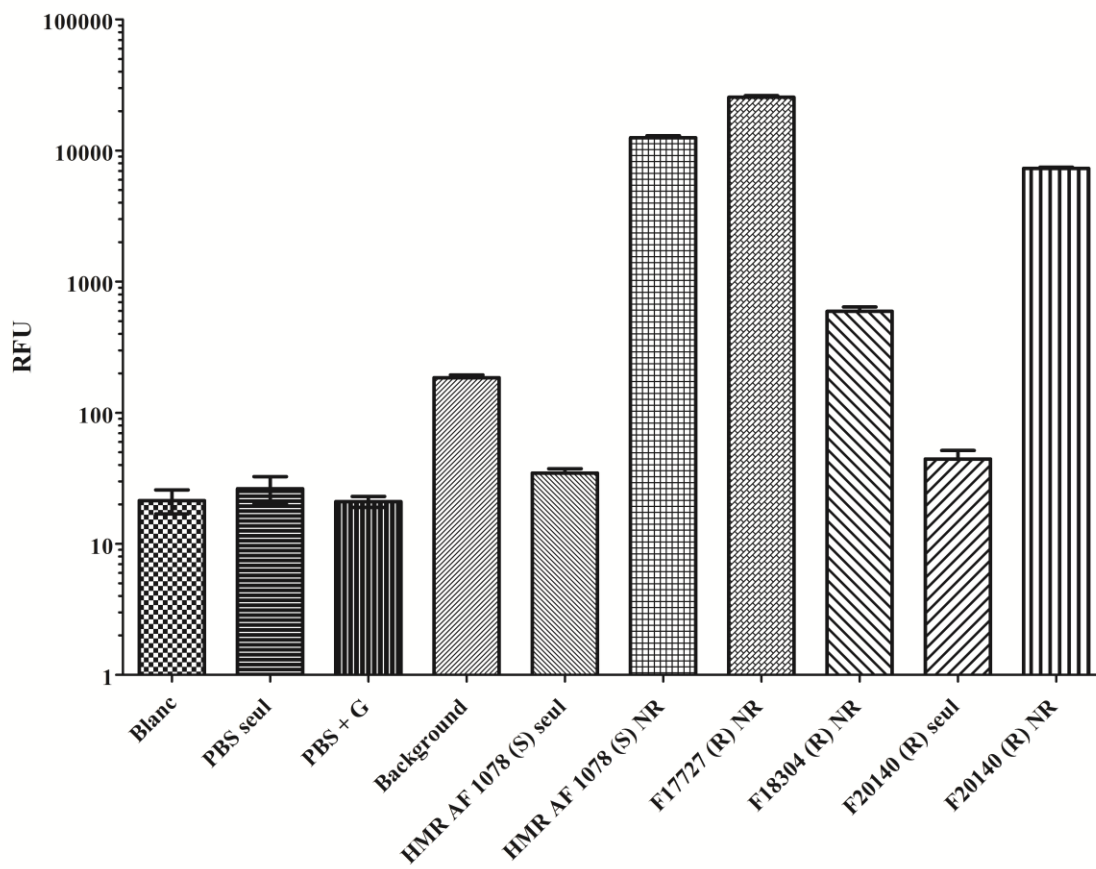


Figure 13. Résultats de la méthode de Nile red en plaque pour les souches contrôles. RFU : *relative fluorescent unit*, unité relative de fluorescence; PBS + G : PBS + 2% glucose; (S) : souche sensible aux triazolés; (R) : souche résistante aux triazolés; NR : Nile red.

Lecture par cellule

Parmi toutes les combinaisons de paramètres, c'est une incubation de 10^5 cellules/ml dans du RPMI-1640 + 10% FBS inactivé, 37°C durant 8 heures, qui s'est avéré être la plus rapide et efficace, atteignant plus de 85% de germination en 8 heures seulement.

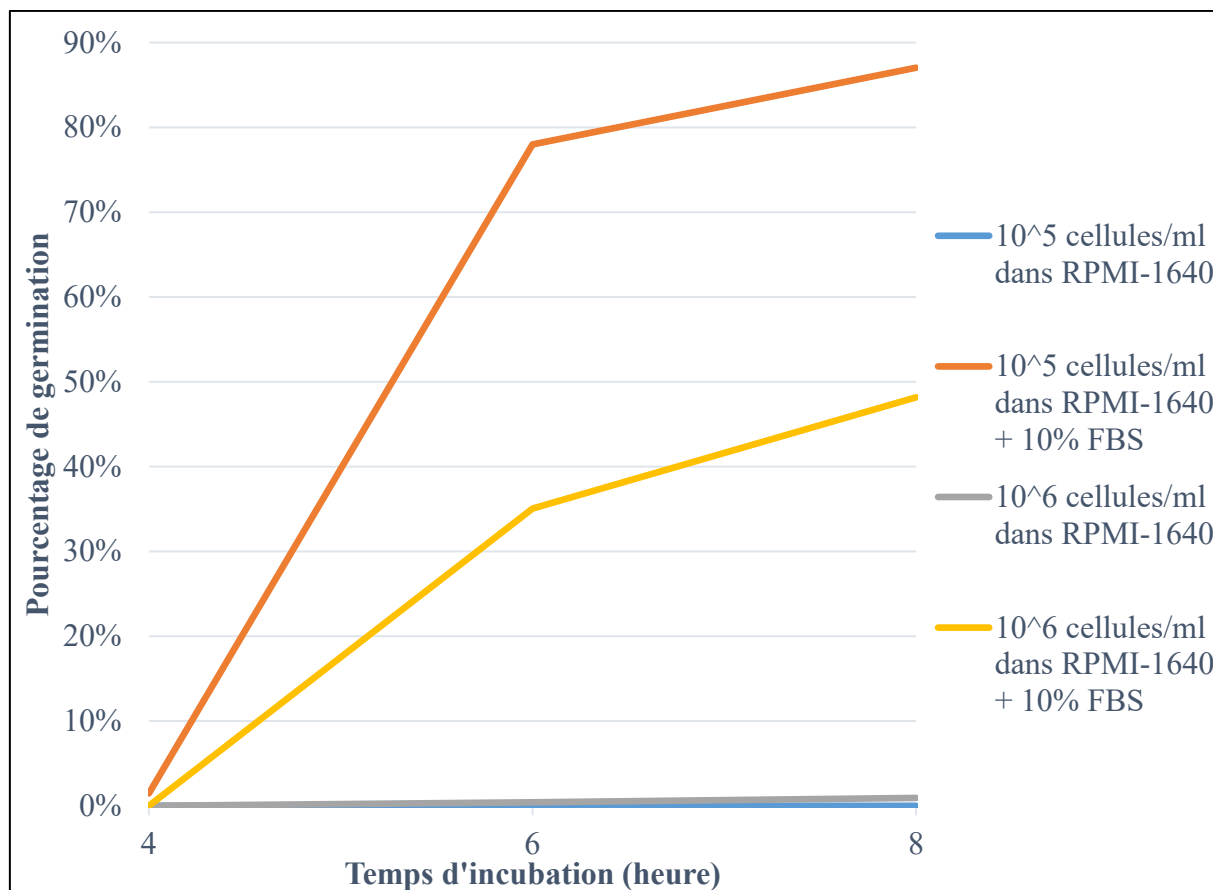


Figure 14. Résultats finaux des essais d'optimisation des conditions de croissance des tubes germinatifs. Croissance à 37°C durant 8 heures de la souche d'*A. fumigatus* AF293 aux concentrations 10^5 et 10^6 cellules/ml dans du RPMI-1640 avec ou sans 10% FBS inactivé.

Dans les essais 1 et 2, nous avons observés comme prévu la souche contrôle résistante aux triazolés *A. fumigatus* F20140, qui surexprime les pompes à efflux, accumuler significativement

moins de Nile red que le contrôle sensible aux triazolés *A. fumigatus* AF293 (Figure 15). L'isolat résistant aux triazolés *A. turcosus* HMR AF 1038 a aussi accumulé significativement moins de Nile red que l'isolat sensible aux triazolés *A. turcosus* HMR AF 23, ce qui est compatible avec la résistance médiée par les pompes à efflux.

Dans l'essai 3, la souche contrôle résistante aux triazolés *A. fumigatus* F20140 a accumulé davantage de Nile red que le contrôle sensible aux triazolés *A. fumigatus* AF293, ce qui va à l'encontre de nos attentes et des résultats des deux premiers essais. Cependant, les isolats de l'étude (HMR AF 23 et HMR AF 1038) ont présenté le même profil que les deux premiers essais. Par manque de temps et de financement, il a été impossible de reprendre l'expérience une quatrième fois pour vérifier le résultat des contrôles lors du troisième essai.

Lors de la comparaison entre les souches d'*A. fumigatus* sensible ATCC® MYA 3627 et résistante HMR AF 270, la souche résistante a démontré une accumulation de fluorescence beaucoup plus grande que n'importe quelle autre souche testée (données non présentées). Deux autres contrôles *A. fumigatus* résistants aux triazolés (F17727 et F18304), aussi avec une surexpression des pompes, ont produit des résultats comparables (données non présentées).

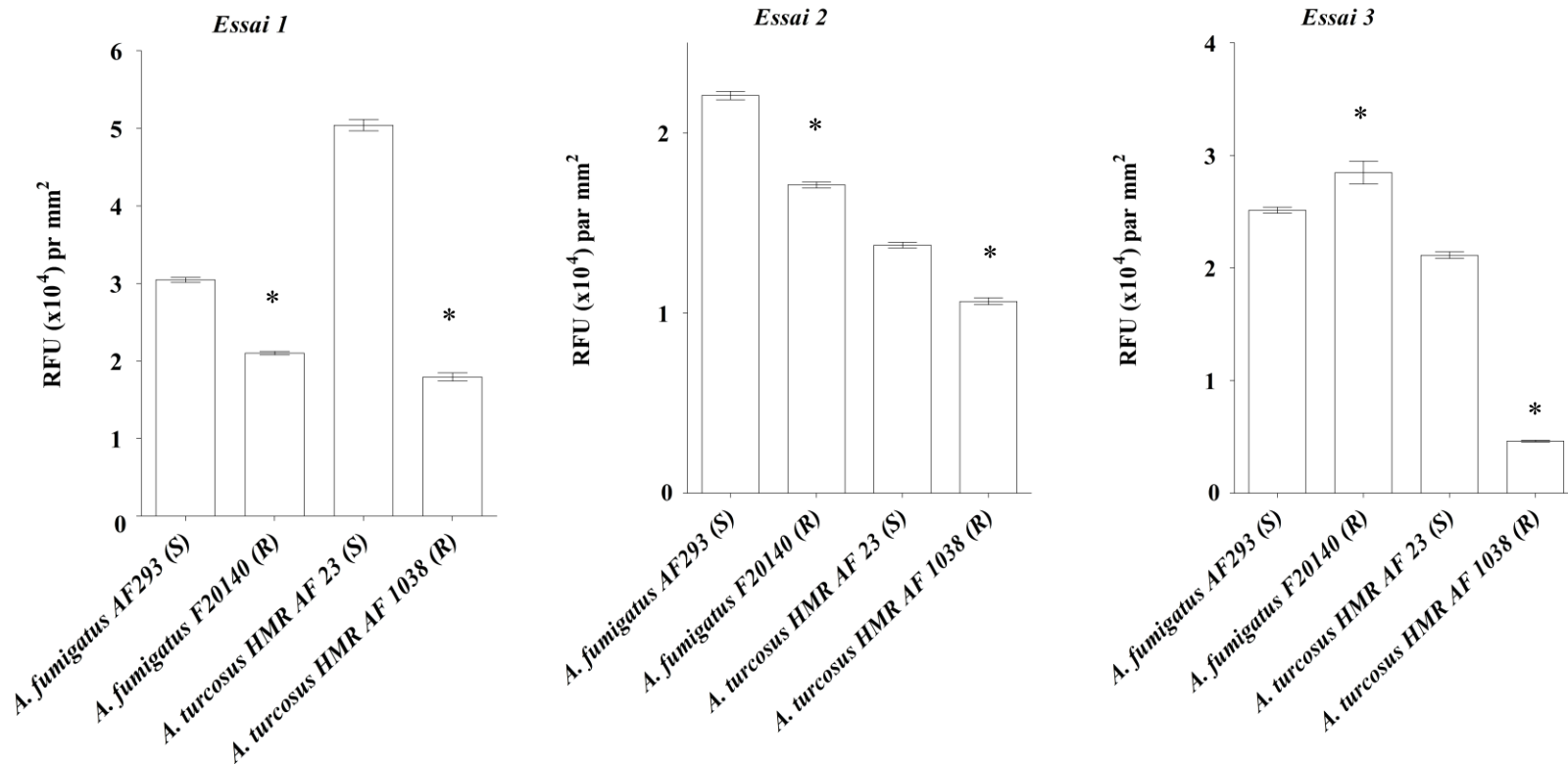


Figure 15. Accumulation de Nile red chez les isolats S (sensibles) et R (résistants) d'*Aspergillus* section *Fumigati*. Les données représentent la moyenne \pm erreur type (de 650 à 2500 valeurs de RFU par souche). *, $P < 0.0001$ comparativement à l'isolat sensible aux triazolés de la même espèce, test t de Student. RFU, *relative fluorescence unit*, unité relative de fluorescence.

Essai d'inhibiteur des pompes à efflux

À toutes les concentrations d'inhibiteur testées, les CMI au voriconazole de la souche contrôle sensible aux triazolés *A. fumigatus* ATCC® MYA 3627 ne diminue que d'un facteur de deux (Figure 16). Comme prédit, la souche résistante aux triazolés *A. fumigatus* F20140, dont la résistance est associée uniquement à une surexpression des pompes à efflux, a démontré une baisse de la CMI d'un facteur de quatre (2 dilutions) aux concentrations d'inhibiteur 32 et 64 µg/ml, par rapport au contrôle, et d'un facteur 16 (4 dilutions) à la concentration de 128 µg/ml.

L'isolat résistant aux triazolés *A. fumigatus* HMR AF 270 a produit un résultat comparable au contrôle *A. fumigatus* F20140, avec une diminution de huit fois (3 dilutions) de la CMI aux concentrations élevées d'inhibiteur. En parallèle, l'inhibiteur de pompes à efflux a démontré peu ou pas d'effet sur les CMI des isolats résistants aux triazolés *A. thermomutatus* HMR AF 39 et *A. lentulus* HMR AF 1185 (Figure 16). De manière intéressante, l'isolat *A. turcosus* HMR AF 23, mis-à-part sa sensibilité au voriconazole, a démontré une baisse de la CMI d'un facteur de 8, de 0,125 à 0,016 µg/ml, en fonction de la concentration d'inhibiteur. Ceci suggère un effet de l'inhibiteur de pompes à efflux sur le niveau basal d'activité. Toutefois, l'isolat résistant aux triazolés *A. turcosus* HMR AF 1038, avec une CMI (2 µg/ml) beaucoup plus élevé que l'isolat sensible d'*A. turcosus*, démontre une baisse d'un facteur de 32 (5 dilutions) de la CMI à la plus forte concentration d'inhibiteur des pompes à efflux (Figure 16).

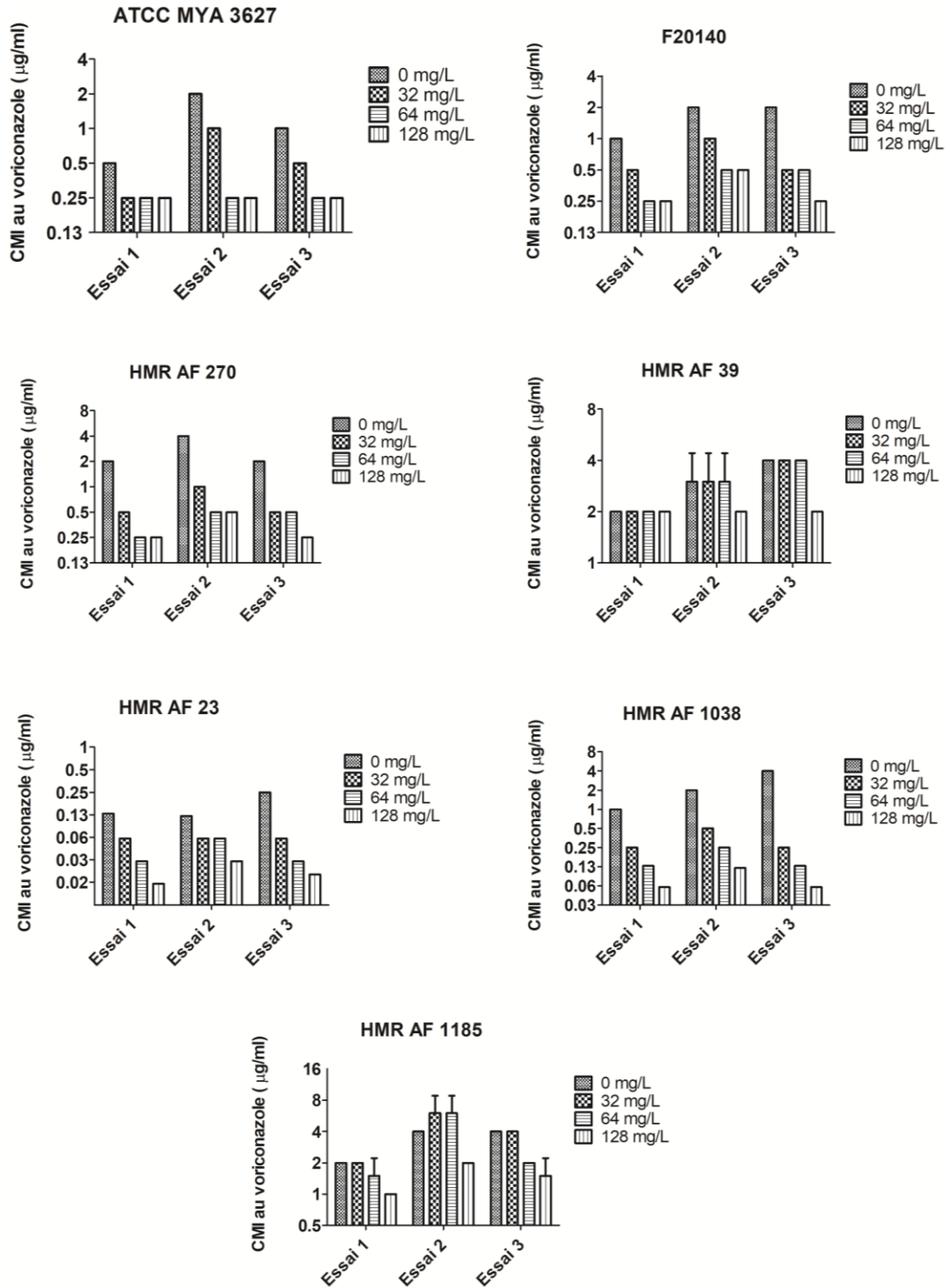


Figure 16. Essais d'inhibition des pompes à efflux. CMI au voriconazole des isolats d'*Aspergillus section Fumigati*, à trois concentrations de l'inhibiteur de pompes à efflux CM-207,110, à trois reprises (N=3).

Séquençage des génomes complets

Le Tableau IV résume les principales informations tirées du séquençage complet des génomes des souches HMR AF 23, HMR AF 1038, HMR AF 39, HMR AF 270 et HMR AF 706. Le pourcentage en GC est très conservé parmi les isolats d'une même espèce.

Tableau IV: Caractéristiques génomiques des souches d'*Aspergillus* séquencées.

Souche (espèce)	HMR AF 23 (<i>A. turcosus</i>)	HMR AF 1038 (<i>A. turcosus</i>)	HMR AF 39 (<i>A. thermomutatus</i>)	HMR AF 270 (<i>A. fumigatus</i>)	HMR AF 706 (<i>A. fumigatus</i>)
Taille (Mb)	29,8	29,3	31,2	29,4	28,1
Contenu en GC	37%	37%	46%	46%	47%
Gènes prédits	10 267	10 141	10 835	9 753	9 484

Mb : mégabases (1 000 000 paires de base)

Identification des gènes métaboliques et de pompes à efflux

Parmi les espèces cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati*, nous avons identifié plusieurs gènes homologues aux pompes à efflux et de gènes métaboliques clés d'*A. fumigatus* AF293 (Tableau A1). Aucun gène homologue n'a été trouvé en utilisant les gènes de référence de *C. albicans*. Les isolats d'*A. fumigatus* HMR AF 270 et HMR AF 706 avaient entre 98% et 100% d'identité par rapport aux gènes de référence, en opposition aux isolats d'*A. turcosus* HMR AF 23 et HMR AF 1038, dont l'identité varie entre 0% et 94%, comparé à la souche de référence d'*A. fumigatus*. Plusieurs orthologues de gènes de transporteurs ABC, qui ont été associés à la résistance aux triazolés (e.g. *abcC/cdr13abcG1*, *AfuMDR1-4*, *atrF*), ont été trouvés chez *A. turcosus*, *A. thermomutatus* et *A. lentulus* (Tableau A1 en Annexe).

Alignement de Cyp51A

L'amplification en trois fragments du gène *cyp51A* de la souche d'*A. lentulus* HMR AF 1185 a bien fonctionné (Figure 17), de même que le séquençage. Nous avons pu assembler les trois différentes séquences, qui comportait des portions chevauchantes, afin d'obtenir la séquence complète du gène.

Suite à l'alignement des séquences d'acides aminés de Cyp51A des isolats du WGS et de la souche d'*A. lentulus* amplifiée par PCR, nous observons une conservation phylogénétique entre les souches de même espèce, alors que plusieurs différences inter-espèces et entre les isolats sensible et résistant aux triazolés d'*A. turcosus* ont été trouvés (Figure 18). Quelques-unes de ces substitutions pourraient être associées à la résistance aux triazolés, en prenant en considération qu'aucune des substitutions de Cyp51A précédemment rapportées comme étant reliées à la résistance aux triazolés n'a été retrouvée parmi les isolats séquencés (Figure 19). Aucune répétition en tandem n'a été trouvée dans les promoteurs des souches étudiées. De plus, la séquence de l'isolat d'*A. fumigatus* HMR AF 270 est identique à la souche de référence CM237. L'isolat résistant aux triazolés d'*A. thermomutatus* HMR AF 1038 a plusieurs substitutions lorsque comparé aux autres espèces.

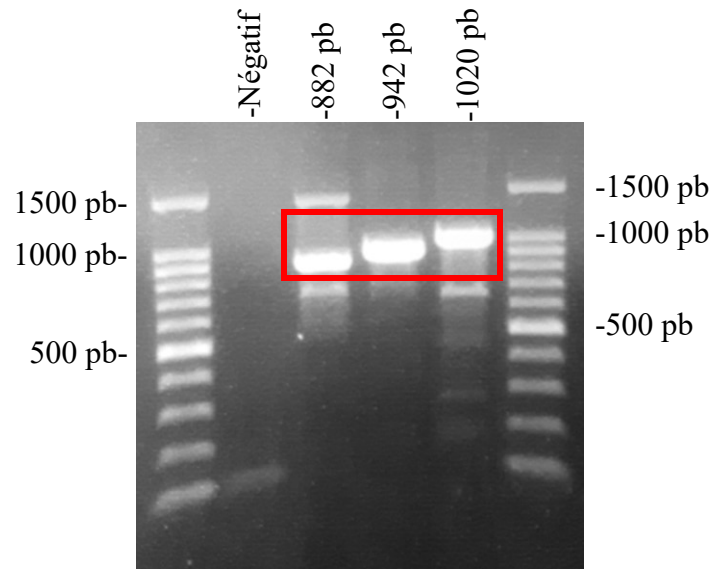


Figure 17. Gel d'agarose des trois fragments d'amplification du *cyp51a* de la souche d'*Aspergillus lentulus* HMR AF 1185. Les fragments d'intérêt sont encadrés en rouge.

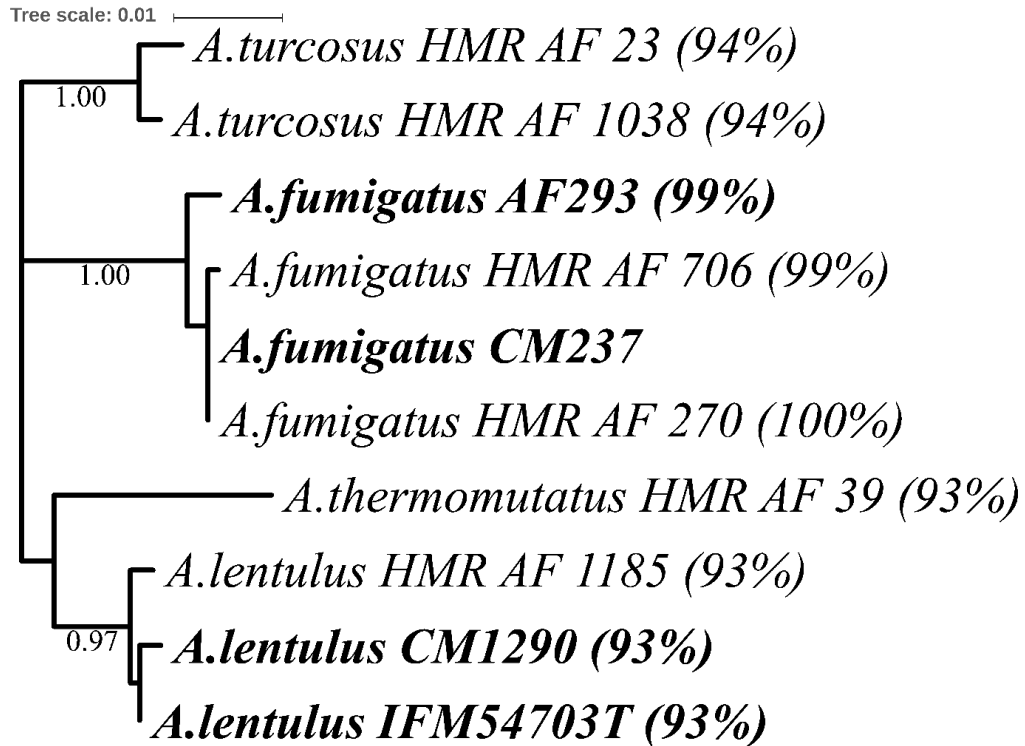


Figure 18. Analyse phylogénique des séquences en acides aminés de Cyp51A des isolats d'*Aspergillus* section *Fumigati* de référence et de l'étude, par méthode de *Maximum Likelihood* basé sur le modèle de matrice JTT. Les souches en GRAS sont les souches contrôles, les chiffres sur les branches sont les valeurs de *bootstrap* et les pourcentages entre parenthèses représentent l'identité par rapport à la souche contrôle *A. fumigatus* CM237.

```

A.fumigatus CM237      1  MVEMLWLTAY  MAVAVLTAIL  LNVVYQLFFR  LWNRTPEPMV  FHWVPFLGST  ISYGIDPYKF  FFACREKYGD  IFTFILLGQK  TTVYLGVQGN  EFILNGKDKD
A.fumigatus AF293      1  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 706  1  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 270  1  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 23    1  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 1038  1  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.thermomutatus HMR AF 39  1  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus CM1290      1  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus IFM54703T   1  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus HMR AF 1185  1  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .

A.fumigatus CM237      101 VNAEEVYSPL  TTPVFGSDVV  YDCPNSKLM  QKKFIKYGLT  QSALESHVPL  IEKEVL DYLR  DSPNFQSSG  RMDISAAMAE  ITIFTAARAL  QGQEVRSKLT
A.fumigatus AF293      101 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 706  101 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 270  101 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 23    101 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 1038  101 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.thermomutatus HMR AF 39  101 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus CM1290      101 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus IFM54703T   101 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus HMR AF 1185  101 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .

A.fumigatus CM237      201 AEFADLYHDL  DKGFTPINFM  LPWAPLPHNK  KRDAAHARMR  SIYVDIINQR  RLDGDKDSQK  SDMIWNLMNC  TYKNGQVQPD  KEIAHMITL  LMAGQHSSSS
A.fumigatus AF293      201 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 706  201 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 270  201 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 23    201 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 1038  201 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.thermomutatus HMR AF 39  201 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus CM1290      201 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus IFM54703T   201 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus HMR AF 1185  201 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .

A.fumigatus CM237      301 ISAWIMLRLA  SQPKVLEELY  QEQLANLGA  GPDGSLPPLQ  YKDLDRKLP  QHVIRETLRI  HSSIHSIMRK  VKSPLFVPGT  PYMIPPGRVL  LASPGVTALS
A.fumigatus AF293      301 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 706  301 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 270  301 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 23    301 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 1038  301 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.thermomutatus HMR AF 39  301 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus CM1290      301 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus IFM54703T   301 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus HMR AF 1185  301 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .

A.fumigatus CM237      401 DEHFPNAGCW  DPHRWENQAT  HEQENDEVVD  YGYGAVSKGT  SSPYLPPGAG  RHRCIGERKA  YVNLGVILAT  IVRHLRFNV  DGKKGVPETD  YSSLFSGPMK
A.fumigatus AF293      401 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 706  401 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 270  401 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 23    401 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 1038  401 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.thermomutatus HMR AF 39  401 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus CM1290      401 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus IFM54703T   401 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus HMR AF 1185  401 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .

A.fumigatus CM237      501 PSIIQWEKRS  RNTS-
A.fumigatus AF293      501 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 706  501 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.fumigatus HMR AF 270  501 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 23    501 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.turcosus HMR AF 1038  501 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.thermomutatus HMR AF 39  501 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus CM1290      501 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus IFM54703T   501 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .
A.lentulus HMR AF 1185  501 . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .  . . . . .

```

Figure 19. Alignement des séquences en acides aminés de Cyp51A des isolats séquencés en entier avec les souches de référence sensibles aux triazolés *A. fumigatus* CM237 et AF293 et résistants *A. lentulus* CM1290 et IFM54703T. Les isolats *A. fumigatus* HMR AF 706 et *A. turcosus* HMR AF 23 sont sensibles aux triazolés. Les isolats *A. fumigatus* HMR AF 270, *A. turcosus* HMR AF 1038, *A. thermomutatus* HMR AF 39 et *A. lentulus* HMR AF 1185 sont résistants aux triazolés. Les acides aminés discordants par rapport à *A. fumigatus* CM237 sont surlignés.

Alignement d'*AtrR*

Les séquences d'acides aminés du facteur de transcription AtrR, qui corégule l'expression de l'enzyme *Cyp51A* et la pompe à efflux *cdr1b* chez *A. fumigatus* (Hagiwara et al., 2017), étaient identiques chez les isolats sensibles aux triazolés *A. fumigatus* AF293, HMR AF 706 et résistant HMR AF 270, excluant la possibilité qu'une mutation dans le gène *atrR* soit responsable de la résistance aux triazolés de notre isolat d'*A. fumigatus* (Figure 20). Toutefois, l'isolat résistant aux triazolés *A. turcosus* HMR AF 1038 contenait une substitution de méthionine vers isoleucine à la position 124 dans la séquence d'acides aminés d'AtrR, en comparaison avec l'isolat sensible aux triazolés *A. turcosus* HMR AF 23. De plus, 12 substitutions d'acides aminés, aux positions 131, 167, 193, 265, 722, 745, 753, 765, 779, 793, 799, 811 et 820, en plus de l'insertion d'une thréonine à la position 757, sont spécifiques à l'isolat résistant aux triazolés *A. thermomutatus* HMR AF 39 en la comparant à tous les autres isolats. Trois substitutions aux positions 175, 802 et 826 ont été trouvées seulement chez la souche *A. lentulus* IFM54703T (Kusuya et al., 2016). Les six introns identifiés dans la séquence du gène d'*atrR* chez *A. oryzae* RIB40 (Machida et al., 2005) ont aussi été trouvés chez les orthologues d'*atrR* d'*A. fumigatus*, *A. turcosus*, *A. thermomutatus* et *A. lentulus*, ce qui suggère une forte conservation génétique entre les espèces des sections *Fumigati* et *Flavi*, dont la dernière comprend *A. oryzae*.

<i>A.oryzae</i> RIB40	1	MDGMEGPDG	MGDFMPMLMN	QQPHLFGGYS	<u>RDSSRGSLN</u>	<u>NVLSNPTTYE</u>	EFGMAGEDNN	<u>DAKRRRIAR</u>	ACDMCRKKKI	KCDGMKPKCS	HCINVRTDCV
<i>A.fumigatus</i> AF293	1	. . . I . D . TES S . G . H N . A . P . I . F F . Q . D S . I . G . A . A . D T . K
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 706	1	. . . I . D . TES S . G . H N . A . P . I . F F . Q . D S . I . G . A . A . D T . K
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 270	1	. . . I . D . TES S . G . H N . A . P . I . F F . Q . D S . I . G . A . A . D T . K
<i>A.turcosus</i> HMR AF 1038	1	. . . I . D . TE A . G . H V . P . P . M . F F . H . D S . I . G . T . A . D . I T . K
<i>A.turcosus</i> HMR AF 23	1	. . . I . D . TE A . G . H V . P . P . M . F F . H . D S . I . G . T . A . D . I T . K
<i>A.thermomutatus</i> HMR AF 39	1	. . . I . D . TES S . G . H N . A . P . I . F F . H . D S . I . G . T . A . D . I T . K
<i>A.lentulus</i> IFM54703T	1	. . . I . D . TES S . G . H N . A . P . I . F F . H . D S . I . G . T . A . D . I T . K
<i>A.oryzae</i> RIB40	100	FTQVEKRNQ	PKGAKYIEGL	ENRNGRMELN	<u>LRISGLLSE</u>	<u>DCKTDLGLT</u>	<u>EKRLADRLSG</u>	<u>NTALNSLKSP</u>	<u>INRKNSSSRF</u>	<u>SSQSCHTACR</u>	<u>HSTPRMDSIS</u>
<i>A.fumigatus</i> AF293	98 Y . H . A S . G . S . N . T . P . H . N . P K . I . N . I . P . S . Q . Q . I A . M . .
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 706	98 Y . H . A S . G . S . N . T . P . H . N . P K . I . N . I . P . S . Q . Q . I A . M .
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 270	98 Y . H . A S . G . S . N . T . P . H . N . P K . I . N . I . P . S . Q . Q . I A . M .
<i>A.turcosus</i> HMR AF 1038	98 Y . H . A T . G . S . N . P . H . N . P K . I . N . I . P . S . Q . Q . I A . M .
<i>A.turcosus</i> HMR AF 23	98 Y . H . A T . G . S . N . P . H . N . P K . I . N . I . P . S . Q . Q . I A . M .
<i>A.thermomutatus</i> HMR AF 39	98 Y . H . A T . G . S . N . P . H . N . P K . I . N . I . P . S . Q . Q . I A . M .
<i>A.lentulus</i> IFM54703T	98 Y . H . T S . G . S . N . T . P . H . N . P K . I . N . I . P . S . Q . Q . I A . M .
<i>A.oryzae</i> RIB40	199	SPHTAATSPN	SPKESETEVE	GLSDMCMCLV	TNNCGETRYI	GSSSGFSIFS	PKGIQWVNEK	TGDTISFCEMI	SSAYVDDNKK	MYWKPEIFSD	IFARRVFKPL
<i>A.fumigatus</i> AF293	198	. . . R E . Q
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 706	198	. . . R E . Q
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 270	198	. . . R E . Q
<i>A.turcosus</i> HMR AF 1038	198	. . . R E . Q
<i>A.turcosus</i> HMR AF 23	198	. . . R E . Q
<i>A.thermomutatus</i> HMR AF 39	198	. . . R E . Q
<i>A.lentulus</i> IFM54703T	198	. . . R E . Q
<i>A.oryzae</i> RIB40	299	PKKKEALSLF	RDFEFNFNCM	PFLFHEPTFM	HLVERQYSRD	PLYEGSGWAS	INVLVAIAHR	LRVMSNLVQP	EEDKRAWLWY	KNAMGVLTLE	TMRNTDLLSV
<i>A.fumigatus</i> AF293	298	. . . D . D . M K . . . D Y R R R
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 706	298	. . . D . D . M K . . . D Y R R R
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 270	298	. . . D . D . M K . . . D Y R R R
<i>A.turcosus</i> HMR AF 1038	298	. . . D . D . M K . . . D Y R R R
<i>A.turcosus</i> HMR AF 23	298	. . . D . D . M K . . . D Y R R R
<i>A.thermomutatus</i> HMR AF 39	298	. . . D . D . M K . . . D Y R R R
<i>A.lentulus</i> IFM54703T	298	. . . D . D . M K . . . D Y R R R
<i>A.oryzae</i> RIB40	399	QALLGMSLFL	QGTFNQPQSF	FLVAAAIRLS	HSIGHLKRGS	GFGLNPVVEE	QRKRVFWYAI	LLDKDICLRS	GRPPVQDDDD	MNVLPSEDP	PDNIGNVPLS
<i>A.fumigatus</i> AF293	398 D
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 706	398 D
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 270	398 D
<i>A.turcosus</i> HMR AF 1038	398 D
<i>A.turcosus</i> HMR AF 23	398 D
<i>A.thermomutatus</i> HMR AF 39	398 D
<i>A.lentulus</i> IFM54703T	398 D
<i>A.oryzae</i> RIB40	499	DGKGFNLFNR	TLCRFATIES	KVYKRLYSK	ASKQSDGELL	NTIGELDLREL	EEWKDSIPID	FRPEHEIKAS	HTPLLILHVVV	LHFSYINCLT	TIHRMSVHHG
<i>A.fumigatus</i> AF293	498	. . . R . S S . M K D L
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 706	498	. . . R . S S . M K D L
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 270	498	. . . R . S S . M K D L
<i>A.turcosus</i> HMR AF 1038	498	. . . R . S S . M D K L
<i>A.turcosus</i> HMR AF 23	498	. . . R . S S . M D K L
<i>A.thermomutatus</i> HMR AF 39	498	. . . R . S S . M D K L
<i>A.lentulus</i> IFM54703T	498	. . . R . S S . M D K L
<i>A.oryzae</i> RIB40	599	YWTSRLSNYA	IQGLNARPLN	PRVFLSAVLC	VTAARASINL	IKYIPHGDFE	CWLLLYYPV	SALVTLFANI	LQNPNDARR	SDVKLMNVVV	NPLSTLVSDS
<i>A.fumigatus</i> AF293	598
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 706	598
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 270	598
<i>A.turcosus</i> HMR AF 1038	598
<i>A.turcosus</i> HMR AF 23	598
<i>A.thermomutatus</i> HMR AF 39	598
<i>A.lentulus</i> IFM54703T	598
<i>A.oryzae</i> RIB40	699	SNGSIRKMLG	LCGEFERIAQ	VVLDRKAEKS	HSKKRKAAP	DEPQDLRQRT	PDENSVSPSS	TKRRTGAPP	TATLFPSSSY	PINLGNTP	DMSNPTRAF
<i>A.fumigatus</i> AF293	698 Y S E . V . N . Q . S E . H . P . A - . T . Q S R . N . V . P . M . S .
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 706	698 Y S E . V . N . Q . S E . H . P . A - . T . Q S R . N . V . P . M . S .
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 270	698 Y S E . V . N . Q . S E . H . P . A - . T . Q S R . N . V . P . M . S .
<i>A.turcosus</i> HMR AF 1038	698 Y S E . V . N . Q . S E . H . P . A - . T . G . S . Q . S R . N . V . P . M . S R . N . V . P . M . S .
<i>A.turcosus</i> HMR AF 23	698 Y S E . V . N . Q . S E . H . P . A - . T . G . S . Q . S R . N . V . P . M . S R . N . V . P . M . S .
<i>A.thermomutatus</i> HMR AF 39	698 R Y S E . V . N . Q . N E . H . P . A - . T . Q R . N . V . P . M . S .
<i>A.lentulus</i> IFM54703T	698 Y S E . V . N . Q . S E . H . P . A - . T . Q S R . N . V . P . M . S .
<i>A.oryzae</i> RIB40	797	PGQTVLGTNG	VPTSMGESMH	EMSGMGHDFP	EMLSFNNDMS	VGFQDQPFQ	TPPTTPMTSF	QQPVPQDLN	QMPMTIENDW	ADMSNFPVF	EG-TNITG
<i>A.fumigatus</i> AF293	796	. . . S . S . R . E . I . P T . S . . . N . I . P . P . N . I . Q A . P . I . A . Q . Y . Q D D . P . L . E . G S . A P . Y . S A . T . A . N L . S
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 706	796	. . . S . S . R . E . I . P T . S . . . N . I . P . P . N . I . Q A . P . I . A . Q . Y . Q D D . P . L . E . G S . A P . Y . S A . T . A . N L . S
<i>A.fumigatus</i> HMR AF 270	796	. . . S . S . R . E . I . P T . S . . . N . I . P . P . N . I . Q A . P . I . A . Q . Y . Q D D . P . L . E . G S . A P . Y . S A . T . A . N L . S
<i>A.turcosus</i> HMR AF 1038	796	. . . S . N . R . E . I . P T . I . T . . . N . I . P . P . N . I . Q A . P . I . C . E . Q D D . P . L . E . G N . A P . Y . S A . T . A . S L . S
<i>A.turcosus</i> HMR AF 23	796	. . . S . N . R . E . I . P T . I . T . . . N . I . P . P . N . I . Q A . P . I . C . E . Q D D . P . L . E . G N . A P . Y . S A . T . A . S L . S
<i>A.thermomutatus</i> HMR AF 39	797	. . . S . N . G . E . I . P T . I . S . . . N . V . P . P . N . I . Q A . P . I . C . E . Q D D . P . L . E . G S . A P . Y . A A . T . A . S L . S
<i>A.lentulus</i> IFM54703T	796	. . . S . N . R . E . I . P T . I . S . . . N . I . P . P . N . I . Q A . P . I . C . E . Q G D . P . L . E . G S . A P . Y . S A . T . A . N L . S

Figure 20. Alignement des séquences en acides aminés d'AtrR des souches séquencées en entier avec les souches de référence *A. oryzae* RIB40 et *A. fumigatus* AF293. Les isolats *A. fumigatus* HMR AF 706 et *A. turcosus* HMR AF 23 sont sensibles aux triazolés. Les isolats *A. fumigatus* HMR AF 270, *A. turcosus* HMR AF 1038, *A. thermomutatus* HMR AF 39 et *A. lentulus* IFM54703T sont résistants aux triazolés. Les acides aminés discordants par rapport à la souche *A. oryzae* RIB40 sont surlignés.

Alignement de HapE

L'alignement des séquences en acide aminée de HapE a mis en évidence quelques substitutions entre la souche de référence et les isolats du WGS (Figure 21). Les deux substitutions A9G et M219I ont été trouvées chez tous les isolats non *A. fumigatus*, alors que les deux *A. turcosus* ont une substitution unique de N269S, indépendamment de la sensibilité aux triazolés. La souche de référence d'*A. lentulus* IFM54703T porte deux substitutions uniques de A180T et S271T, alors que l'isolat d'*A. thermomutatus* HMR AF 39 a trois substitutions uniques, soit G207A, N269K et S270F. Les isolats d'*A. turcosus* HMR AF 23 et HMR AF 1038 et celui d'*A. thermomutatus* HMR AF 39 semblent avoir un codon STOP décalé, comparativement aux autres souches, résultant en une extension de 3 acides aminés dans la séquence de HapE, comparativement aux autres isolats (Figure 21). Les deux isolats d'*A. fumigatus* ont des séquences identiques à celle d'AF293.


```

A.fumigatus AF293      1  MEQSSQSTAQ QQGRQQPVYD TRNGGHYGAS AALSAQGYAP VAELYGTWA NVNQGLQGT A RDILTTYWQH IINHLESDNH DYKIHQLPLA RIKKVMKADP
A.fumigatus HMR AF 706 1  .....
A.fumigatus HMR AF 270 1  .....
A.turcosus HMR AF 23   1  .....G.....
A.turcosus HMR AF 1038 1  .....G.....
A.thermomutatus HMR AF 39 1  .....G.....
A.lentulus IFM54703T  1  .....G.....

A.fumigatus AF293      101 EVKMISAEAP ILFARGCDIF ITELTMRAWI HAEDNKRRTL QRSDIAAALS KSDMFDFLID IVPREETASH AKRSSQTTAG AAGSSAATGA QLPPSQHGVO
A.fumigatus HMR AF 706 101 .....
A.fumigatus HMR AF 270 101 .....
A.turcosus HMR AF 23   101 .....
A.turcosus HMR AF 1038 101 .....
A.thermomutatus HMR AF 39 101 .....
A.lentulus IFM54703T  101 .....

A.fumigatus AF293      201 HPPHHMGPPD YGSLGQHGMG QDQFYRQPTM YGGAVQSDPT AAYGQPQSQI FEGMYPYPH LPPQVQCNS S---
A.fumigatus HMR AF 706 201 .....
A.fumigatus HMR AF 270 201 .....
A.turcosus HMR AF 23   201 .....I.....S. AQHI
A.turcosus HMR AF 1038 201 .....I.....S. AQHI
A.thermomutatus HMR AF 39 201 .....A.....I.....KF AQHI
A.lentulus IFM54703T  201 .....I.....T---

```

Figure 21. Alignement des séquences en acide aminés de HapE des souches séquencés en entier avec la souche contrôle sensible aux triazolés *A. fumigatus* AF293. Les isolats *A. fumigatus* HMR AF 706 et *A. turcosus* HMR AF 23 sont sensibles aux triazolés. Les isolats *A. fumigatus* HMR AF 270, *A. turcosus* HMR AF 1038, *A. thermomutatus* HMR AF 39 et *A. lentulus* IFM54703T sont résistants aux triazolés. Les acides aminés discordants par rapport à la souche *A. fumigatus* AF293 sont surlignés.

Discussion

Il est primordial de connaître la prévalence des espèces cryptiques de la section *Fumigati*, car celles-ci peuvent causer l'aspergillose invasive et plusieurs sont résistantes aux antifongiques triazolés, qui représentent la pierre angulaire du traitement de cette infection. Bien que la prévalence de ces espèces soit faible (0,7 à 5,4%) dans les pays où elle a été étudiée (Espagne (Alastruey-Izquierdo et al., 2013; Escribano et al., 2013), États-Unis (Balajee et al., 2009), Portugal (Sabino et al., 2014), Brésil (Negri et al., 2014), Danemark (Mortensen et al., 2011) et République Tchèque (Hubka et al., 2012)), il est important de continuer de surveiller leur émergence. Il est également pertinent d'étudier la prévalence de ces espèces dans plusieurs pays différents, puisque les données accumulées à ce jour démontrent une variabilité géographique. C'est pourquoi nous avons décidé, dans cette étude, de décrire la prévalence des espèces cryptiques dans une vaste collection de souches conservées à l'hôpital Maisonneuve-Rosemont sur une période de 14 ans. Nous avons également entrepris d'étudier les mécanismes de résistances des isolats résistants aux antifongiques triazolés, ceux-ci étant très peu connus pour les espèces cryptiques de la section *Fumigati*.

Suite au dépistage des isolats potentiellement cryptiques et de leur confirmation par séquençage du gène *benA* (Figure 9 et 10), nous avons pu observer que la prévalence d'espèces cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati* est très faible à Montréal (1,4%; Figure 11). Cette prévalence se situe à l'intérieur de l'étendue des valeurs qui ont été rapportées dans le reste du monde (Tableau I). La plupart des espèces isolées dans le projet ont déjà été décrites comme agent d'AI, soit *A. thermomutatus*, *A. hiratsukae* et *A. lentulus* (Alastruey-Izquierdo et al., 2014; Balajee et al., 2009; Escribano et al., 2013; Howard, 2014; Hubka et al., 2012; Lamoth, 2016;

Negri et al., 2014; Van Der Linden et al., 2011b). Par contre, *A. turcosus*, une nouvelle espèce décrite en 2008, n'a seulement été isolée que de systèmes d'air climatisé en Corée du Sud (Hong et al., 2008). Aucune autre mention de cette espèce n'a été faite depuis. De façon intéressante, quatre isolats de cette espèce ont été identifiés dans ce projet.

De plus, avec les résultats d'antifongigrammes (Tableau III), la prévalence d'isolats résistants aux triazolés, de n'importe quelle espèce d'*Aspergillus* section *Fumigati*, a été découverte encore plus faible, soit 1%. Toutefois, un bref calcul démontre que 64% (9 sur 14) des isolats d'espèces cryptiques de la section *Fumigati* décrites dans ce projet étaient résistants à au moins un antifongique triazolé. Qui plus est, l'un des isolats d'*A. turcosus* (HMR AF 1038) s'est avéré être résistant à tous les triazolés testés, soit l'itraconazole, le posaconazole et le voriconazole, selon les valeurs seuil d'*A. fumigatus* (Espinel-Ingroff et al., 2010). C'est la première fois que de la résistance aux triazolés est décrite chez cette espèce. Un isolat d'*A. fumigatus* (HMR AF 270) était aussi résistant à tous les triazolés. Tel qu'attendu, les sept isolats d'*A. thermomutatus* et l'*A. lentulus* étaient résistants à au moins un triazolé. En effet, ces espèces sont bien connues pour leur résistance intrinsèque à ces antifongiques (Alastruey-Izquierdo et al., 2014; Alastruey-Izquierdo et al., 2013; Alcazar-Fuoli et al., 2011; Alcazar-Fuoli et al., 2008; Balajee et al., 2005a; Balajee et al., 2005b; Balajee et al., 2009; Escribano et al., 2013; Howard, 2014; Lamoth, 2016; Mellado et al., 2011; Mortensen et al., 2011; Negri et al., 2014). Aussi comme précédemment décrit, l'isolat d'*A. hiratsukae* était sensible à tous les triazolés (Alastruey-Izquierdo et al., 2014; Alcazar-Fuoli et al., 2008).

Suite à la révision des dossiers médicaux, seulement trois de ces isolats (cryptiques et/ou résistants aux triazolés) ont été trouvés responsables d'aspergillose, dont aucune n'était létale

(Tableau III). Tous les autres isolats étaient seulement présents comme colonisant pulmonaire. Bien que ces chiffres soient très petits, il est intéressant de noter que ce ratio se compare à *A. fumigatus*, pour lequel une étude avait démontré que 42% des isolats cliniques étaient considérés comme associés à une maladie, contre 58% à une colonisation (Perfect et al., 2001).

Nous avons ensuite utilisé différentes méthodes complémentaires pour caractériser les mécanismes de résistance de quatre isolats. En premier lieu, le séquençage génomique nous a permis d'établir les différences dans le gène codant pour la cible des triazolés, soit *cyp51a*. Le séquençage a aussi confirmé l'existence d'orthologues pour de nombreux gènes codant pour des pompes d'efflux parmi les espèces cryptiques retrouvées dans notre étude. Finalement, les séquences de certains facteurs de transcription clés, exerçant un contrôle sur l'expression de *cyp51a*, de pompes d'efflux, ou les deux, ont pu être explorées. En second lieu, nous avons utilisé deux essais phénotypiques mesurer l'activité de pompes d'efflux, dont l'un a été développé par nous. Il s'agit d'une méthode utilisant le fluorochrome lipophile Nile red, qui intègre la membrane cellulaire des organismes, mais qui est expulsé par les pompes à efflux.

Plusieurs mutations entre les *cyp51a* de la souche sensible et de la souche résistante aux triazolés d'*A. turcosus*, HMR AF 23 et HMR AF 1038 respectivement, ont été observées (Figure 19). Puisque l'isolat sensible d'*A. turcosus* présente certaines mutations aussi présentes chez l'isolat résistant, ces mutations n'auraient aucun effet sur la résistance aux triazolés. Ces mutations sont probablement le résultat de la divergence évolutive vis-à-vis *A. fumigatus* (Figure 18). Dans l'essai d'accumulation du Nile red, l'isolat résistant aux triazolés HMR AF 1038 a démontré une accumulation significativement moindre de Nile red que l'isolat sensible de la même espèce, HMR AF 23 (Figure 15). En parallèle, la diminution des CMI en présence de

l'IPE est un indice très important de l'implication de pompes à efflux dans la résistance aux antifongiques triazolés de certains des isolats testés. Les isolats sensibles aux triazolés ont des CMI comparables en présence ou en l'absence d'IPE, tandis que les isolats résistants avec une surexpression des pompes à efflux, tel que le contrôle *A. fumigatus* F20140 (Fraczek et al., 2013), ont des CMI décroissantes en présence d'IPE (Figure 11), ce qui est le cas de la souche *A. turcosus* HMR AF 1038. Collectivement, ces résultats suggèrent donc que l'isolat d'*A. turcosus* HMR AF 1038 utiliserait, au moins en partie, la surexpression des pompes à efflux comme mécanisme de résistance aux antifongiques triazolés (Rajendran et al., 2011). La mutation de méthionine vers isoleucine à la position 124 de la protéine AtrR d'*A. turcosus* HMR AF 1038 pourrait être impliquée dans la résistance aux antifongiques triazolés, puisque la souche sensible de la même espèce (HMR AF 23) ne la possède pas. Aussi, les isolats sensible et résistant d'*A. turcosus* partagent les mêmes substitutions et le même prolongement de trois acides aminés de la protéine HapE. Ces modifications n'ont probablement aucun effet sur la résistance, puisqu'elles sont présentes chez ces deux isolats. Pour la souche d'*A. turcosus* HMR AF 1038, la résistance n'origine donc pas de ce gène.

Puisqu'aucun isolat d'*A. thermomutatus* n'est sensible aux triazolés, il est impossible de déterminer quelle substitution de l'isolat HMR AF 39 (comparativement à *A. fumigatus* CM237) est responsable de la résistance, sans analyses plus poussées, telle que la mutagenèse dirigée. Il est donc fortement possible qu'*A. thermomutatus* utilise un mécanisme de résistance semblable à *A. lentulus*, soit par *cyp51a* (Alcazar-Fuoli et al., 2011). De plus, les résultats en présence de l'IPE, pour cet isolat, suggèrent que le mécanisme de résistance n'est pas relié aux pompes à efflux, ou sinon que des mutations du gène *cyp51a* sont dominantes quant à l'expression du phénotype de résistance à l'égard des triazolés. *A. thermomutatus* HMR AF 39 a plusieurs

substitutions dans la séquence protéique d'AtrR. Le rôle de ces mutations pourrait être éclairci par essais de transformation. Dans le cas de la souche d'*A. thermomutatus* HMR AF 39, l'une ou plusieurs des substitutions G207A, N269K ou S270F de la protéine HapE pourraient être à l'origine de la résistance. Des essais de réversion dirigée seraient nécessaires pour vérifier cette théorie.

L'espèce cryptique d'*Aspergillus* section *Fumigati* *A. lentulus* a précédemment été décrite comme ayant un Cyp51A avec une fonction enzymatique normale différente d'*A. fumigatus*, avec une conformation différente qui cause un blocage du canal utilisé par le voriconazole pour atteindre le site actif, résultant en une résistance intrinsèque aux triazolés (Alcazar-Fuoli et al., 2011). Les substitutions présentes dans la séquence protéique de Cyp51A (3 en comparant aux autres *A. lentulus*) ne semblent pas avoir d'effet sur la résistance intrinsèque de l'isolat. L'absence de diminution significative de la CMI en présence de l'IPE corrobore cette preuve de l'implication simplement du Cyp51A dans le mécanisme de résistance. Dû à cette connaissance, et au fait que le génome de cet isolat n'a pas été séquencé dans cette étude, aucune étude au niveau d'AtrR et HapE n'a été effectuée.

Puisque l'isolat HMR AF 270 présente une séquence en acides aminés de Cyp51A identique à la souche sensible de référence (CM237), il était probable que les pompes d'efflux soient responsables du phénotype de résistance. En effet, les résultats d'IPE suggèrent l'implication de pompes à efflux, dû à une diminution importante des valeurs de CMI. Toutefois, l'isolat a accumulé beaucoup plus de Nile red que la souche sensible de référence. Il est connu que plusieurs types de pompes ont des substrats différents, et l'essai par IPE a été réalisé avec un inhibiteur à large spectre (Bhattacharya et al., 2016). Il est donc possible que l'inhibiteur ait

inhibé une pompe qui n'expulse pas le Nile red, expliquant ainsi la discordance. En effet, il a été démontré que ce fluorochrome est expulsé par les pompes à efflux de type ABC CaCdr1p et CaCdr2p et de type MFS CaMdr1p chez *C. albicans* et chez les transporteurs hétérologues de *Saccharomyces cerevisiae* (Ivnitski-Steele et al., 2009). Il se pourrait alors que la souche HMR AF 270 surexprime des pompes récemment identifiées, tel que AtrF, comme mécanisme de résistance aux triazolés. Dans ce cas, l'utilisation d'une autre molécule fluorescente qui est exportée par les pompes surexprimées par la souche HMR AF 270 pourrait mettre en évidence une telle surexpression. De plus, les séquences protéiques d'AtrR et de HapE sont identiques aux séquences de la souche sensible aux triazolés d'*A. fumigatus* AF293. Ce qui indique qu'aucune implication supplémentaire de ces facteurs de transcription n'est en jeu. Donc, il doit y avoir une pompe à efflux qui est surexprimée ou mutée, permettant la résistance.

Nous avons malgré tout rencontré quelques limites lors de notre étude. La plus évidente est que l'essai de Nile red mise au point n'est pas 100% reproductible, puisque deux essais sur trois seulement ont donnés des résultats concordants. Cette méthode aurait donc besoin d'optimisation supplémentaire. Plusieurs autres gènes et facteurs de transcription auraient été intéressants à explorer : Cyp51B, AtrF, MDR1, etc. Cependant, le manque de temps et de ressources nous a obligé à restreindre les gènes et mécanismes étudiés. Dans le même ordre d'idée, plusieurs autres mécanismes de résistance sont connus chez *Candida albicans* et *A. fumigatus* que nous n'avons pas pu explorer chez nos souches résistantes.

Les prochaines expériences de cette étude comprennent une modélisation des protéines Cyp51A des isolats résistants afin d'étudier l'impact des substitutions sur l'interaction avec les antifongiques triazolés. Certaines des mutations soulevées devraient être substituées de manière

dirigée afin d'étudier leur contribution au phénotype de résistance. De plus, une Reverse Transcriptase PCR quantitative (*qRT-PCR*), un séquençage de l'ARN (*RNASeq*) ou une puce à ADN (*microarray*) permettraient d'étudier les niveaux d'expression des gènes de pompes à efflux et de Cyp51A des isolats résistants.

En conclusion, ce projet a permis de découvrir de nouveaux isolats d'espèces cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati*. De plus, les isolats résistants aux antifongiques triazolés de la collection ont permis d'explorer les mécanismes de résistance, soit les pompes à efflux, le *cyp51a* et les facteurs de transcription (Tableau V). Il a permis d'augmenter les connaissances au sens qu'un isolat ne doit pas nécessairement son phénotype de résistance à un seul mécanisme, mais à une synergie complexe de plusieurs mécanismes, résultant d'événements qui peuvent se produire autant chez un patient sous antifongiques que dans l'environnement. La découverte d'un isolat clinique résistant aux triazolés d'une espèce cryptique, *A. turcosus*, est aussi un énorme pas vers l'avant concernant la diversité et l'émergence d'espèces résistantes présentes en milieu clinique. En effet, la distinction et description des espèces pouvant être pathogènes permet d'adapter l'approche clinique face à une culture positive pour ces organismes. Enfin, le séquençage génomique des isolats servira à poursuivre l'étude des mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez les *Aspergillus* section *Fumigati* et ainsi contribuer à la lutte contre ces pathogènes.

Tableau V : Résumé des résultats obtenus chez les isolats d'*Aspergillus* section *Fumigati* résistants aux triazolés.

Isolat	Espèce	Résistance aux triazolés	IPE	Nile red	<i>cyp51a</i>	Mécanisme de résistance possible
HMR AF 39	<i>A. thermomutatus</i>	ITC, PSC, VRC	Stable	N/A	Mutant	<i>cyp51a</i>
HMR AF 270	<i>A. fumigatus</i>	ITC, PSC, VRC	Baisse	Accumule	Sauvage	Pompes
HMR AF 1038	<i>A. turcosus</i>	ITC, PSC, VRC	Baisse	Expulse	Mutant	Pompes
HMR AF 1185	<i>A. lentulus</i>	ITC, VRC	Stable	N/A	Mutant	<i>cyp51a</i>

IPE, inhibiteur de pompes à efflux; N/A, non applicable.

Bibliographie

- Abad, A., Fernandez-Molina, J. V., Bikandi, J., Ramirez, A., Margareto, J., Sendino, J., Hernando, F. L., Ponton, J., Garaizar, J. et Rementeria, A. (2010). What makes *Aspergillus fumigatus* a successful pathogen? Genes and molecules involved in invasive aspergillosis. *Rev Iberoam Micol*, 27(4), 155-182. doi: 10.1016/j.riam.2010.10.003
- Abdolrasouli, A., Rhodes, J., Beale, M. A., Hagen, F., Rogers, T. R., Chowdhary, A., Meis, J. F., Armstrong-James, D. et Fisher, M. C. (2015). Genomic Context of Azole Resistance Mutations in *Aspergillus fumigatus* Determined Using Whole-Genome Sequencing. *MBio*, 6(3), e00536. doi: 10.1128/mBio.00536-15
- Ahmad, S., Khan, Z., Hagen, F. et Meis, J. F. (2014). Occurrence of triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in outdoor and hospital environment in Kuwait. *Environ Res*, 133, 20-26. doi: 10.1016/j.envres.2014.05.009
- Aimanianda, V., Bayry, J., Bozza, S., Kniemeyer, O., Perruccio, K., Elluru, S. R., Clavaud, C., Paris, S., Brakhage, A. A., Kaveri, S. V., Romani, L. et Latge, J. P. (2009). Surface hydrophobin prevents immune recognition of airborne fungal spores. *Nature*, 460(7259), 1117-1121. doi: 10.1038/nature08264
- Alastruey-Izquierdo, A., Alcazar-Fuoli, L. et Cuenca-Estrella, M. (2014). Antifungal susceptibility profile of cryptic species of *Aspergillus*. *Mycopathologia*, 178(5-6), 427-433. doi: 10.1007/s11046-014-9775-z

Alastruey-Izquierdo, A., Mellado, E. et Cuenca-Estrella, M. (2012). Current section and species complex concepts in *Aspergillus*: recommendations for routine daily practice. *Ann N Y Acad Sci*, 1273(1), 18-24. doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06822.x

Alastruey-Izquierdo, A., Mellado, E., Pelaez, T., Peman, J., Zapico, S., Alvarez, M., Rodriguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M. et Group, F. S. (2013). Population-based survey of filamentous fungi and antifungal resistance in Spain (FILPOP Study). *Antimicrob Agents Chemother*, 57(7), 3380-3387. doi: 10.1128/AAC.00383-13

Alcazar-Fuoli, L., Cuesta, I., Rodriguez-Tudela, J. L., Cuenca-Estrella, M., Sanglard, D. et Mellado, E. (2011). Three-dimensional models of 14 α -sterol demethylase (Cyp51A) from *Aspergillus lentulus* and *Aspergillus fumigatus*: an insight into differences in voriconazole interaction. *Int J Antimicrob Agents*, 38(5), 426-434. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2011.06.005

Alcazar-Fuoli, L., Mellado, E., Alastruey-Izquierdo, A., Cuenca-Estrella, M. et Rodriguez-Tudela, J. L. (2008). *Aspergillus* section *Fumigati*: antifungal susceptibility patterns and sequence-based identification. *Antimicrob Agents Chemother*, 52(4), 1244-1251. doi: 10.1128/AAC.00942-07

Alvarez-Moreno, C., Lavergne, R. A., Hagen, F., Morio, F., Meis, J. F. et Le Pape, P. (2017). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* harboring TR34/L98H, TR46/Y121F/T289A and TR53 mutations related to flower fields in Colombia. *Sci Rep*, 7, 45631. doi: 10.1038/srep45631

- Araujo, R., Amorim, A. et Gusmao, L. (2012). Diversity and specificity of microsatellites within *Aspergillus* section *Fumigati*. *BMC Microbiol*, 12, 154. doi: 10.1186/1471-2180-12-154
- Ascioglu, S., Rex, J. H., de Pauw, B., Bennett, J. E., Bille, J., Crokaert, F., Denning, D. W., Donnelly, J. P., Edwards, J. E., Erjavec, Z., Fiere, D., Lortholary, O., Maertens, J., Meis, J. F., Patterson, T. F., Ritter, J., Selleslag, D., Shah, P. M., Stevens, D. A., Walsh, T. J., Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for, R., Treatment of, C., Mycoses Study Group of the National Institute of, A. et Infectious, D. (2002). Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis*, 34(1), 7-14. doi: 10.1086/323335
- Astvad, K. M., Jensen, R. H., Hassan, T. M., Mathiasen, E. G., Thomsen, G. M., Pedersen, U. G., Christensen, M., Hilberg, O. et Arendrup, M. C. (2014). First detection of TR46/Y121F/T289A and TR34/L98H alterations in *Aspergillus fumigatus* isolates from azole-naive patients in Denmark despite negative findings in the environment. *Antimicrob Agents Chemother*, 58(9), 5096-5101. doi: 10.1128/AAC.02855-14
- Badali, H., Vaezi, A., Haghani, I., Yazdanparast, S. A., Hedayati, M. T., Mousavi, B., Ansari, S., Hagen, F., Meis, J. F. et Chowdhary, A. (2013). Environmental study of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H mutations in the *cyp51A* gene in Iran. *Mycoses*, 56(6), 659-663. doi: 10.1111/myc.12089

- Balajee, S. A., Gribskov, J., Brandt, M., Ito, J., Fothergill, A. et Marr, K. A. (2005a). Mistaken identity: *Neosartorya pseudofischeri* and its anamorph masquerading as *Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 43(12), 5996-5999. doi: 10.1128/JCM.43.12.5996-5999.2005
- Balajee, S. A., Gribskov, J. L., Hanley, E., Nickle, D. et Marr, K. A. (2005b). *Aspergillus lentulus* sp. nov., a new sibling species of *A. fumigatus*. *Eukaryot Cell*, 4(3), 625-632. doi: 10.1128/EC.4.3.625-632.2005
- Balajee, S. A., Houbraken, J., Verweij, P. E., Hong, S. B., Yaghuchi, T., Varga, J. et Samson, R. A. (2007). *Aspergillus* species identification in the clinical setting. *Stud Mycol*, 59, 39-46. doi: 10.3114/sim.2007.59.05
- Balajee, S. A., Kano, R., Baddley, J. W., Moser, S. A., Marr, K. A., Alexander, B. D., Andes, D., Kontoyiannis, D. P., Perrone, G., Peterson, S., Brandt, M. E., Pappas, P. G. et Chiller, T. (2009). Molecular identification of *Aspergillus* species collected for the Transplant-Associated Infection Surveillance Network. *J Clin Microbiol*, 47(10), 3138-3141. doi: 10.1128/JCM.01070-09
- Balajee, S. A., Nickle, D., Varga, J. et Marr, K. A. (2006). Molecular studies reveal frequent misidentification of *Aspergillus fumigatus* by morphotyping. *Eukaryot Cell*, 5(10), 1705-1712. doi: 10.1128/EC.00162-06

- Bhattacharya, S., Sobel, J. D. et White, T. C. (2016). A Combination Fluorescence Assay Demonstrates Increased Efflux Pump Activity as a Resistance Mechanism in Azole-Resistant Vaginal *Candida albicans* Isolates. *Antimicrob Agents Chemother*, 60(10), 5858-5866. doi: 10.1128/AAC.01252-16
- Boisvert, S., Laviolette, F. et Corbeil, J. (2010). Ray: simultaneous assembly of reads from a mix of high-throughput sequencing technologies. *J Comput Biol*, 17(11), 1519-1533. doi: 10.1089/cmb.2009.0238
- Boisvert, S., Raymond, F., Godzaridis, E., Laviolette, F. et Corbeil, J. (2012). Ray Meta: scalable de novo metagenome assembly and profiling. *Genome Biol*, 13(12), R122. doi: 10.1186/gb-2012-13-12-r122
- Brown, G. D., Denning, D. W., Gow, N. A., Levitz, S. M., Netea, M. G. et White, T. C. (2012). Hidden killers: human fungal infections. *Sci Transl Med*, 4(165), 165rv113. doi: 10.1126/scitranslmed.3004404
- Cadena, J., Thompson, G. R., 3rd et Patterson, T. F. (2016). Invasive Aspergillosis: Current Strategies for Diagnosis and Management. *Infect Dis Clin North Am*, 30(1), 125-142. doi: 10.1016/j.idc.2015.10.015
- Camps, S. M., Dutilh, B. E., Arendrup, M. C., Rijs, A. J., Snelders, E., Huynen, M. A., Verweij, P. E. et Melchers, W. J. (2012). Discovery of a HapE mutation that causes azole resistance

in *Aspergillus fumigatus* through whole genome sequencing and sexual crossing. *PLoS One*, 7(11), e50034. doi: 10.1371/journal.pone.0050034

Casselton, L. et Zolan, M. (2002). The art and design of genetic screens: filamentous fungi. *Nat Rev Genet*, 3(9), 683-697. doi: 10.1038/nrg889

Cerqueira, G. C., Arnaud, M. B., Inglis, D. O., Skrzypek, M. S., Binkley, G., Simison, M., Miyasato, S. R., Binkley, J., Orvis, J., Shah, P., Wymore, F., Sherlock, G. et Wortman, J. R. (2014). The *Aspergillus* Genome Database: multispecies curation and incorporation of RNA-Seq data to improve structural gene annotations. *Nucleic Acids Research*, 42(D1), D705-D710. doi: 10.1093/nar/gkt1029

Chaudhary, N., Datta, K., Askin, F. B., Staab, J. F. et Marr, K. A. (2012). Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator regulates epithelial cell response to *Aspergillus* and resultant pulmonary inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 185(3), 301-310. doi: 10.1164/rccm.201106-1027OC

Chen, Y., Wang, H., Lu, Z., Li, P., Zhang, Q., Jia, T., Zhao, J., Tian, S., Han, X., Chen, F., Zhang, C., Jia, X., Huang, L., Qu, F. et Han, L. (2015). Emergence of TR46/Y121F/T289A in an *Aspergillus fumigatus* isolate from a Chinese patient. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(11), 7148-7150. doi: 10.1128/AAC.00887-15

Chiang, L. Y., Sheppard, D. C., Gravelat, F. N., Patterson, T. F. et Filler, S. G. (2008). *Aspergillus fumigatus* stimulates leukocyte adhesion molecules and cytokine production

by endothelial cells in vitro and during invasive pulmonary disease. *Infect Immun*, 76(8), 3429-3438. doi: 10.1128/IAI.01510-07

Chowdhary, A., Kathuria, S., Randhawa, H. S., Gaur, S. N., Klaassen, C. H. et Meis, J. F. (2012). Isolation of multiple-triazole-resistant *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR/L98H mutations in the cyp51A gene in India. *J Antimicrob Chemother*, 67(2), 362-366. doi: 10.1093/jac/dkr443

Chowdhary, A., Sharma, C., Kathuria, S., Hagen, F. et Meis, J. F. (2014). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with the environmental TR46/Y121F/T289A mutation in India. *J Antimicrob Chemother*, 69(2), 555-557. doi: 10.1093/jac/dkt397

CLSI et Wayne, P. (2008). *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Filamentous Fungi; Approved Standard- Second Edition M38-A2*.

Cornely, O. A., Maertens, J., Winston, D. J., Perfect, J., Ullmann, A. J., Walsh, T. J., Helfgott, D., Holowiecki, J., Stockelberg, D., Goh, Y. T., Petrini, M., Hardalo, C., Suresh, R. et Angulo-Gonzalez, D. (2007). Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med*, 356(4), 348-359. doi: 10.1056/NEJMoa061094

da Silva Ferreira, M. E., Capellaro, J. L., dos Reis Marques, E., Malavazi, I., Perlin, D., Park, S., Anderson, J. B., Colombo, A. L., Arthington-Skaggs, B. A., Goldman, M. H. et Goldman, G. H. (2004). In vitro evolution of itraconazole resistance in *Aspergillus*

fumigatus involves multiple mechanisms of resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(11), 4405-4413. doi: 10.1128/AAC.48.11.4405-4413.2004

De Pauw, B., Walsh, T. J., Donnelly, J. P., Stevens, D. A., Edwards, J. E., Calandra, T., Pappas, P. G., Maertens, J., Lortholary, O., Kauffman, C. A., Denning, D. W., Patterson, T. F., Maschmeyer, G., Bille, J., Dismukes, W. E., Herbrecht, R., Hope, W. W., Kibbler, C. C., Kullberg, B. J., Marr, K. A., Munoz, P., Odds, F. C., Perfect, J. R., Restrepo, A., Ruhnke, M., Segal, B. H., Sobel, J. D., Sorrell, T. C., Viscoli, C., Wingard, J. R., Zaoutis, T., Bennett, J. E., European Organization for, R., Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative, G., National Institute of, A. et Infectious Diseases Mycoses Study Group Consensus, G. (2008). Revised definitions of invasive fungal disease from the European Organization for Research and Treatment of Cancer/Invasive Fungal Infections Cooperative Group and the National Institute of Allergy and Infectious Diseases Mycoses Study Group (EORTC/MSG) Consensus Group. *Clin Infect Dis*, 46(12), 1813-1821. doi: 10.1086/588660

Delorme, J. (1997). *Mycologie médicale*. Mont-Royal, Qué.: Mont-Royal, Qué. : Décarie éditeur.

Denning, D. W., Venkateswarlu, K., Oakley, K. L., Anderson, M. J., Manning, N. J., Stevens, D. A., Warnock, D. W. et Kelly, S. L. (1997). Itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(6), 1364-1368.

- Dewi, I. M. W., van de Veerdonk, F. L. et Gresnigt, M. S. (2017). The Multifaceted Role of T-Helper Responses in Host Defense against *Aspergillus fumigatus*. *J Fungi (Basel)*, 3(4). doi: 10.3390/jof3040055
- Dufresne, S. F., Cole, D. C., Denning, D. W. et Sheppard, D. C. (2017). Serious fungal infections in Canada. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 36(6), 987-992. doi: 10.1007/s10096-017-2922-y
- Dyer, P. S. et Paoletti, M. (2005). Reproduction in *Aspergillus fumigatus*: sexuality in a supposedly asexual species? *Med Mycol*, 43 Suppl 1, S7-14.
- Escribano, P., Pelaez, T., Munoz, P., Bouza, E. et Guinea, J. (2013). Is azole resistance in *Aspergillus fumigatus* a problem in Spain? *Antimicrob Agents Chemother*, 57(6), 2815-2820. doi: 10.1128/AAC.02487-12
- Espinel-Ingroff, A., Diekema, D. J., Fothergill, A., Johnson, E., Pelaez, T., Pfaller, M. A., Rinaldi, M. G., Canton, E. et 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(9), 3251-3257. doi: 10.1128/JCM.00536-10
- Etienne, K. A., Gade, L., Lockhart, S. R., Diekema, D. J., Messer, S. A., Pfaller, M. A. et Balajee, S. A. (2009). Screening of a large global *Aspergillus fumigatus* species complex

collection by using a species-specific microsphere-based Luminex assay. *J Clin Microbiol*, 47(12), 4171-4172. doi: 10.1128/JCM.01415-09

Fraczek, M. G., Bromley, M., Buied, A., Moore, C. B., Rajendran, R., Rautemaa, R., Ramage, G., Denning, D. W. et Bowyer, P. (2013). The cdr1B efflux transporter is associated with non-cyp51a-mediated itraconazole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*, 68(7), 1486-1496. doi: 10.1093/jac/dkt075

Gams, W., Christensen, M., Onions, A. H., Pitt, J. I. et Samson, R. A. (1986). Infrageneric Taxa of *Aspergillus*. Dans R. A. Samson & J. I. Pitt (dir.), *Advances in Penicillium and Aspergillus Systematics* (p. 55-62). Boston, MA: Springer US.

Giusiano, G. E., Piontelli, E., Fernandez, M. S., Mangiaterra, M. L., Cattana, M. E., Kocsube, S. et Varga, J. (2017). Biodiversity of species of *Aspergillus* section Fumigati in semi-desert soils in Argentina. *Rev Argent Microbiol*, 49(3), 247-254. doi: 10.1016/j.ram.2017.02.002

Grahl, N., Puttikamonkul, S., Macdonald, J. M., Gamcsik, M. P., Ngo, L. Y., Hohl, T. M. et Cramer, R. A. (2011). In vivo hypoxia and a fungal alcohol dehydrogenase influence the pathogenesis of invasive pulmonary aspergillosis. *PLoS Pathog*, 7(7), e1002145. doi: 10.1371/journal.ppat.1002145

Greenspan, P., Mayer, E. P. et Fowler, S. D. (1985). Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. *J Cell Biol*, 100(3), 965-973.

Gsaller, F., Hortschansky, P., Furukawa, T., Carr, P. D., Rash, B., Capilla, J., Muller, C., Bracher, F., Bowyer, P., Haas, H., Brakhage, A. A. et Bromley, M. J. (2016). Sterol Biosynthesis and Azole Tolerance Is Governed by the Opposing Actions of SrbA and the CCAAT Binding Complex. *PLoS Pathog*, 12(7), e1005775. doi: 10.1371/journal.ppat.1005775

Guarro, J., Kallas, E. G., Godoy, P., Karenina, A., Gene, J., Stchigel, A. et Colombo, A. L. (2002). Cerebral aspergillosis caused by *Neosartorya hiratsukae*, Brazil. *Emerg Infect Dis*, 8(9), 989-991. doi: 10.3201/eid0809.020073

Guillaume, V. et Alcindor, L.-G. (2006). *Mycologie*. (1^e éd.). Paris, France: De Boeck Supérieur.

Gurevich, A., Saveliev, V., Vyahhi, N. et Tesler, G. (2013). QUASt: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*, 29(8), 1072-1075. doi: 10.1093/bioinformatics/btt086

Hagiwara, D., Miura, D., Shimizu, K., Paul, S., Ohba, A., Gonoï, T., Watanabe, A., Kamei, K., Shintani, T., Moye-Rowley, W. S., Kawamoto, S. et Gomi, K. (2017). A Novel Zn²-Cys⁶ Transcription Factor AtrR Plays a Key Role in an Azole Resistance Mechanism of *Aspergillus fumigatus* by Co-regulating *cyp51A* and *cdr1B* Expressions. *PLoS Pathog*, 13(1), e1006096. doi: 10.1371/journal.ppat.1006096

Hagiwara, D., Takahashi, H., Fujimoto, M., Sugahara, M., Misawa, Y., Gonoï, T., Itoyama, S., Watanabe, A. et Kamei, K. (2016a). Multi-azole resistant *Aspergillus fumigatus* harboring

Cyp51A TR46/Y121F/T289A isolated in Japan. *J Infect Chemother*, 22(8), 577-579. doi: 10.1016/j.jiac.2016.01.015

Hagiwara, D., Watanabe, A., Kamei, K. et Goldman, G. H. (2016b). Epidemiological and Genomic Landscape of Azole Resistance Mechanisms in *Aspergillus* Fungi. *Front Microbiol*, 7, 1382. doi: 10.3389/fmicb.2016.01382

Han, J. I. et Na, K. J. (2008). Dermatitis caused by *Neosartorya hiratsukae* infection in a hedgehog. *J Clin Microbiol*, 46(9), 3119-3123. doi: 10.1128/JCM.00737-08

Heinekamp, T., Thywissen, A., Macheleidt, J., Keller, S., Valiante, V. et Brakhage, A. A. (2012). *Aspergillus fumigatus* melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. *Front Microbiol*, 3, 440. doi: 10.3389/fmicb.2012.00440

Henry, T., Iwen, P. C. et Hinrichs, S. H. (2000). Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2. *Journal of Clinical Microbiology*, 38(4), 1510-1515.

Herbrecht, R., Denning, D. W., Patterson, T. F., Bennett, J. E., Greene, R. E., Oestmann, J. W., Kern, W. V., Marr, K. A., Ribaud, P., Lortholary, O., Sylvester, R., Rubin, R. H., Wingard, J. R., Stark, P., Durand, C., Caillot, D., Thiel, E., Chandrasekar, P. H., Hodges, M. R., Schlamm, H. T., Troke, P. F., de Pauw, B., Invasive Fungal Infections Group of the European Organisation for, R., Treatment of, C. et the Global *Aspergillus* Study, G.

(2002). Voriconazole versus amphotericin B for primary therapy of invasive aspergillosis. *N Engl J Med*, 347(6), 408-415. doi: 10.1056/NEJMoa020191

Hong, S. B., Kim, D. H., Park, I. C., Samson, R. A. et Shin, H. D. (2010). Isolation and identification of *Aspergillus* section *fumigati* strains from arable soil in Korea. *Mycobiology*, 38(1), 1-6. doi: 10.4489/MYCO.2010.38.1.001

Hong, S. B., Shin, H. D., Hong, J., Frisvad, J. C., Nielsen, P. V., Varga, J. et Samson, R. A. (2008). New taxa of *Neosartorya* and *Aspergillus* in *Aspergillus* section *Fumigati*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 93(1-2), 87-98. doi: 10.1007/s10482-007-9183-1

Hope, W. W., Walsh, T. J. et Denning, D. W. (2005). The invasive and saprophytic syndromes due to *Aspergillus* spp. *Med Mycol*, 43 Suppl 1, S207-238.

Howard, S. J. (2014). Multi-resistant aspergillosis due to cryptic species. *Mycopathologia*, 178(5-6), 435-439. doi: 10.1007/s11046-014-9774-0

Hubka, V., Kubatova, A., Mallatova, N., Sedlacek, P., Melichar, J., Skorepova, M., Mencl, K., Lyskova, P., Sramkova, B., Chudickova, M., Hamal, P. et 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(6), 601-610. doi: 10.3109/13693786.2012.667578

- Ivnitski-Steele, I., Holmes, A. R., Lamping, E., Monk, B. C., Cannon, R. D. et Sklar, L. A. (2009). Identification of Nile red as a fluorescent substrate of the *Candida albicans* ATP-binding cassette transporters Cdr1p and Cdr2p and the major facilitator superfamily transporter Mdr1p. *Anal Biochem*, 394(1), 87-91. doi: 10.1016/j.ab.2009.07.001
- Jarv, H., Lehtmaa, J., Summerbell, R. C., Hoekstra, E. S., Samson, R. A. et Naaber, P. (2004). Isolation of *Neosartorya pseudofischeri* from blood: first hint of pulmonary Aspergillosis. *J Clin Microbiol*, 42(2), 925-928.
- Kamai, Y., Lossinsky, A. S., Liu, H., Sheppard, D. C. et Filler, S. G. (2009). Polarized response of endothelial cells to invasion by *Aspergillus fumigatus*. *Cell Microbiol*, 11(1), 170-182. doi: 10.1111/j.1462-5822.2008.01247.x
- Kanafani, Z. A. et Perfect, J. R. (2008). Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. *Clin Infect Dis*, 46(1), 120-128. doi: 10.1086/524071
- Knox, B. P., Blachowicz, A., Palmer, J. M., Romsdahl, J., Huttenlocher, A., Wang, C. C., Keller, N. P. et Venkateswaran, K. (2016). Characterization of *Aspergillus fumigatus* Isolates from Air and Surfaces of the International Space Station. *mSphere*, 1(5). doi: 10.1128/mSphere.00227-16
- Krishnan, S., Manavathu, E. K. et Chandrasekar, P. H. (2005). A comparative study of fungicidal activities of voriconazole and amphotericin B against hyphae of *Aspergillus fumigatus*. *J Antimicrob Chemother*, 55(6), 914-920. doi: 10.1093/jac/dki100

- Kumar, S., Stecher, G. et Tamura, K. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol*, 33(7), 1870-1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
- Kusuya, Y., Sakai, K., Kamei, K., Takahashi, H. et Yaguchi, T. (2016). Draft Genome Sequence of the Pathogenic Filamentous Fungus *Aspergillus lentulus* IFM 54703T. *Genome Announc*, 4(1). doi: 10.1128/genomeA.01568-15
- Kwon-Chung, K. J. et Sugui, J. A. (2009). Sexual reproduction in *Aspergillus* species of medical or economical importance: why so fastidious? *Trends Microbiol*, 17(11), 481-487. doi: 10.1016/j.tim.2009.08.004
- Lamoth, F. (2016). *Aspergillus fumigatus*-Related Species in Clinical Practice. *Front Microbiol*, 7, 683. doi: 10.3389/fmicb.2016.00683
- Lass-Flörl, C. et Cuenca-Estrella, M. (2017). Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease. *J Antimicrob Chemother*, 72(suppl_1), i5-i11. doi: 10.1093/jac/dkx028
- Latge, J. P. (1999). *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clin Microbiol Rev*, 12(2), 310-350.
- Liu, M., Zeng, R., Zhang, L., Li, D., Lv, G., Shen, Y., Zheng, H., Zhang, Q., Zhao, J., Zheng, N. et Liu, W. (2015). Multiple *cyp51A*-based mechanisms identified in azole-resistant

isolates of *Aspergillus fumigatus* from China. *Antimicrob Agents Chemother*, 59(7), 4321-4325. doi: 10.1128/AAC.00003-15

Lockhart, S. R., Frade, J. P., Etienne, K. A., Pfaller, M. A., Diekema, D. J. et Balajee, S. A. (2011). Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from the ARTEMIS global surveillance study is primarily due to the TR/L98H mutation in the *cyp51A* gene. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(9), 4465-4468. doi: 10.1128/AAC.00185-11

Losada, L., Sugui, J. A., Eckhaus, M. A., Chang, Y. C., Mounaud, S., Figat, A., Joardar, V., Pakala, S. B., Pakala, S., Venepally, P., Fedorova, N., Nierman, W. C. et Kwon-Chung, K. J. (2015). Genetic Analysis Using an Isogenic Mating Pair of *Aspergillus fumigatus* Identifies Azole Resistance Genes and Lack of MAT Locus's Role in Virulence. *PLoS Pathog*, 11(4), e1004834. doi: 10.1371/journal.ppat.1004834

Machida, M., Asai, K., Sano, M., Tanaka, T., Kumagai, T., Terai, G., Kusumoto, K., Arima, T., Akita, O., Kashiwagi, Y., Abe, K., Gomi, K., Horiuchi, H., Kitamoto, K., Kobayashi, T., Takeuchi, M., Denning, D. W., Galagan, J. E., Nierman, W. C., Yu, J., Archer, D. B., Bennett, J. W., Bhatnagar, D., Cleveland, T. E., Fedorova, N. D., Gotoh, O., Horikawa, H., Hosoyama, A., Ichinomiya, M., Igarashi, R., Iwashita, K., Juvvadi, P. R., Kato, M., Kato, Y., Kin, T., Kokubun, A., Maeda, H., Maeyama, N., Maruyama, J., Nagasaki, H., Nakajima, T., Oda, K., Okada, K., Paulsen, I., Sakamoto, K., Sawano, T., Takahashi, M., Takase, K., Terabayashi, Y., Wortman, J. R., Yamada, O., Yamagata, Y., Anazawa, H., Hata, Y., Koide, Y., Komori, T., Koyama, Y., Minetoki, T., Suharnan, S., Tanaka, A.,

- Isono, K., Kuhara, S., Ogasawara, N. et Kikuchi, H. (2005). Genome sequencing and analysis of *Aspergillus oryzae*. *Nature*, 438(7071), 1157-1161. doi: 10.1038/nature04300
- Mellado, E., Alcazar-Fuoli, L., Cuenca-Estrella, M. et Rodriguez-Tudela, J. L. (2011). Role of *Aspergillus lentulus* 14-alpha sterol demethylase (Cyp51A) in azole drug susceptibility. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(12), 5459-5468. doi: 10.1128/AAC.05178-11
- Mellado, E., Diaz-Guerra, T. M., Cuenca-Estrella, M. et Rodriguez-Tudela, J. L. (2001). Identification of two different 14-alpha sterol demethylase-related genes (cyp51A and cyp51B) in *Aspergillus fumigatus* and other *Aspergillus* species. *J Clin Microbiol*, 39(7), 2431-2438. doi: 10.1128/JCM.39.7.2431-2438.2001
- Mellado, E., Garcia-Effron, G., Alcazar-Fuoli, L., Melchers, W. J., Verweij, P. E., Cuenca-Estrella, M. et Rodriguez-Tudela, J. L. (2007). A new *Aspergillus fumigatus* resistance mechanism conferring in vitro cross-resistance to azole antifungals involves a combination of cyp51A alterations. *Antimicrob Agents Chemother*, 51(6), 1897-1904. doi: 10.1128/AAC.01092-06
- Montesinos, I., Dodemont, M., Lagrou, K., Jacobs, F., Etienne, I. et Denis, O. (2014). New case of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation in Belgium. *J Antimicrob Chemother*, 69(12), 3439-3440. doi: 10.1093/jac/dku289
- Mortensen, K. L., Johansen, H. K., Fursted, K., Knudsen, J. D., Gahrn-Hansen, B., Jensen, R. H., Howard, S. J. et Arendrup, M. C. (2011). A prospective survey of *Aspergillus* spp. in

respiratory tract samples: prevalence, clinical impact and antifungal susceptibility. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 30(11), 1355-1363. doi: 10.1007/s10096-011-1229-7

Mushi, M. F., Buname, G., Bader, O., Gross, U. et Mshana, S. E. (2016). *Aspergillus fumigatus* carrying TR34/L98H resistance allele causing complicated suppurative otitis media in Tanzania: Call for improved diagnosis of fungi in sub-Saharan Africa. *BMC Infect Dis*, 16, 464. doi: 10.1186/s12879-016-1796-4

Nascimento, A. M., Goldman, G. H., Park, S., Marras, S. A., Delmas, G., Oza, U., Lolans, K., Dudley, M. N., Mann, P. A. et Perlin, D. S. (2003). Multiple resistance mechanisms among *Aspergillus fumigatus* mutants with high-level resistance to itraconazole. *Antimicrob Agents Chemother*, 47(5), 1719-1726.

Negri, C. E., Goncalves, S. S., Xafranski, H., Bergamasco, M. D., Aquino, V. R., Castro, P. T. et Colombo, A. L. (2014). Cryptic and rare *Aspergillus* species in Brazil: prevalence in clinical samples and in vitro susceptibility to triazoles. *J Clin Microbiol*, 52(10), 3633-3640. doi: 10.1128/JCM.01582-14

Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R., Kim, H. S., Arroyo, J., Berriman, M., Abe, K., Archer, D. B., Bermejo, C., Bennett, J., Bowyer, P., Chen, D., Collins, M., Coulsen, R., Davies, R., Dyer, P. S., Farman, M., Fedorova, N., Fedorova, N., Feldblyum, T. V., Fischer, R., Fosker, N., Fraser, A., Garcia, J. L., Garcia, M. J., Goble, A., Goldman, G. H., Gomi, K., Griffith-Jones, S., Gwilliam, R., Haas, B., Haas, H., Harris, D., Horiuchi, H., Huang, J., Humphray, S., Jimenez, J., Keller, N., Khouri, H., Kitamoto, K., Kobayashi,

T., Konzack, S., Kulkarni, R., Kumagai, T., Lafon, A., Latge, J. P., Li, W., Lord, A., Lu, C., Majoros, W. H., May, G. S., Miller, B. L., Mohamoud, Y., Molina, M., Monod, M., Mouyna, I., Mulligan, S., Murphy, L., O'Neil, S., Paulsen, I., Penalva, M. A., Pertea, M., Price, C., Pritchard, B. L., Quail, M. A., Rabinowitsch, E., Rawlins, N., Rajandream, M. A., Reichard, U., Renauld, H., Robson, G. D., Rodriguez de Cordoba, S., Rodriguez-Pena, J. M., Ronning, C. M., Rutter, S., Salzberg, S. L., Sanchez, M., Sanchez-Ferrero, J. C., Saunders, D., Seeger, K., Squares, R., Squares, S., Takeuchi, M., Tekaia, F., Turner, G., Vazquez de Aldana, C. R., Weidman, J., White, O., Woodward, J., Yu, J. H., Fraser, C., Galagan, J. E., Asai, K., Machida, M., Hall, N., Barrell, B. et Denning, D. W. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 438(7071), 1151-1156. doi: 10.1038/nature04332

Nurk, S., Bankevich, A., Antipov, D., Gurevich, A., Korobeynikov, A., Lapidus, A., Prjibelsky, A., Pyshkin, A., Sirotkin, A., Sirotkin, Y., Stepanauskas, R., McLean, J., Lasken, R., Clingenpeel, S. R., Woyke, T., Tesler, G., Alekseyev, M. A. et Pevzner, P. A. (2013). Assembling Genomes and Mini-metagenomes from Highly Chimeric Reads. Dans M. Deng, R. Jiang, F. Sun & X. Zhang (dir.), *Research in Computational Molecular Biology: 17th Annual International Conference, RECOMB 2013, Beijing, China, April 7-10, 2013. Proceedings* (p. 158-170). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg.

O'Gorman, C. M., Fuller, H. et Dyer, P. S. (2009). Discovery of a sexual cycle in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. *Nature*, 457(7228), 471-474. doi: 10.1038/nature07528

- Odds, F. C., Brown, A. J. et Gow, N. A. (2003). Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol*, 11(6), 272-279.
- Onishi, K., Muhammad Sarumoh, B., Hagiwara, D., Watanabe, A., Kamei, K. et Toyotome, T. (2017). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* Containing a 34-bp Tandem Repeat in *cyp51A* Promoter is Isolated from the Environment in Japan. *Med Mycol J*, 58(2), E67-E70. doi: 10.3314/mmj.17-00002
- Ozmerdiven, G. E., Ak, S., Ener, B., Agca, H., Cilo, B. D., Tunca, B. et Akalin, H. (2015). First determination of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* strains carrying the TR34/L98H mutations in Turkey. *J Infect Chemother*, 21(8), 581-586. doi: 10.1016/j.jiac.2015.04.012
- Padhye, A. A., Godfrey, J. H., Chandler, F. W. et Peterson, S. W. (1994). Osteomyelitis caused by *Neosartorya pseudofischeri*. *J Clin Microbiol*, 32(11), 2832-2836.
- Paris, S., Debeaupuis, J. P., Crameri, R., Carey, M., Charles, F., Prevost, M. C., Schmitt, C., Philippe, B. et Latge, J. P. (2003). Conidial hydrophobins of *Aspergillus fumigatus*. *Appl Environ Microbiol*, 69(3), 1581-1588. doi: 10.1128/AEM.69.3.1581-1588.2003
- Park, S. J. et Mehrad, B. (2009). Innate immunity to *Aspergillus* species. *Clin Microbiol Rev*, 22(4), 535-551. doi: 10.1128/CMR.00014-09

- Paul, S., Diekema, D. et Moye-Rowley, W. S. (2017). Contributions of both ATP-Binding Cassette Transporter and Cyp51A Proteins Are Essential for Azole Resistance in *Aspergillus fumigatus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 61(5). doi: 10.1128/AAC.02748-16
- Pelaez, T., Monteiro, M. C., Garcia-Rubio, R., Bouza, E., Gomez-Lopez, A. et Mellado, E. (2015). First detection of *Aspergillus fumigatus* azole-resistant strain due to Cyp51A TR46/Y121F/T289A in an azole-naïve patient in Spain. *New Microbes New Infect*, 6, 33-34. doi: 10.1016/j.nmni.2015.04.005
- Perfect, J. R., Cox, G. M., Lee, J. Y., Kauffman, C. A., de Repentigny, L., Chapman, S. W., Morrison, V. A., Pappas, P., Hiemenz, J. W., Stevens, D. A. et Mycoses Study, G. (2001). The impact of culture isolation of *Aspergillus* species: a hospital-based survey of aspergillosis. *Clin Infect Dis*, 33(11), 1824-1833. doi: 10.1086/323900
- Rajendran, R., Mowat, E., McCulloch, E., Lappin, D. F., Jones, B., Lang, S., Majithiya, J. B., Warn, P., Williams, C. et Ramage, G. (2011). Azole resistance of *Aspergillus fumigatus* biofilms is partly associated with efflux pump activity. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(5), 2092-2097. doi: 10.1128/AAC.01189-10
- Rambach, G., Blum, G., Latge, J. P., Fontaine, T., Heinekamp, T., Hagleitner, M., Jeckstrom, H., Weigel, G., Wurtinger, P., Pfaller, K., Krappmann, S., Loffler, J., Lass-Flörl, C. et Speth, C. (2015). Identification of *Aspergillus fumigatus* Surface Components That

Mediate Interaction of Conidia and Hyphae With Human Platelets. *J Infect Dis*, 212(7), 1140-1149. doi: 10.1093/infdis/jiv191

Raper, B. K. et Fennell, D. I. (1965). *The Genus Aspergillus*. Baltimore, MD: Williams and Wilkins.

Sabino, R., Verissimo, C., Parada, H., Brandao, J., Viegas, C., Carolino, E., Clemons, K. V. et Stevens, D. A. (2014). Molecular screening of 246 Portuguese *Aspergillus* isolates among different clinical and environmental sources. *Med Mycol*, 52(5), 519-529. doi: 10.1093/mmy/myu006

Samson, R. A., Hong, S., Peterson, S. W., Frisvad, J. C. et Varga, J. (2007). Polyphasic taxonomy of *Aspergillus* section *Fumigati* and its teleomorph *Neosartorya*. *Stud Mycol*, 59, 147-203. doi: 10.3114/sim.2007.59.14

Samson, R. A., Visagie, C. M., Houbraken, J., Hong, S. B., Hubka, V., Klaassen, C. H., Perrone, G., Seifert, K. A., Susca, A., Tanney, J. B., Varga, J., Kocsube, S., Szigeti, G., Yaguchi, T. et Frisvad, J. C. (2014). Phylogeny, identification and nomenclature of the genus *Aspergillus*. *Stud Mycol*, 78, 141-173. doi: 10.1016/j.simyco.2014.07.004

Scharf, D. H., Heinekamp, T., Remme, N., Hortschansky, P., Brakhage, A. A. et Hertweck, C. (2012). Biosynthesis and function of gliotoxin in *Aspergillus fumigatus*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 93(2), 467-472. doi: 10.1007/s00253-011-3689-1

Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P. et Cardona, A. (2012). Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods*, 9(7), 676-682. doi: 10.1038/nmeth.2019

Schindelin, J., Rueden, C. T., Hiner, M. C. et Eliceiri, K. W. (2015). The ImageJ ecosystem: An open platform for biomedical image analysis. *Mol Reprod Dev*, 82(7-8), 518-529. doi: 10.1002/mrd.22489

Schubert, S., Barker, K. S., Znaidi, S., Schneider, S., Dierolf, F., Dunkel, N., Aid, M., Boucher, G., Rogers, P. D., Raymond, M. et Morschhauser, J. (2011). Regulation of efflux pump expression and drug resistance by the transcription factors Mrr1, Upc2, and Cap1 in *Candida albicans*. *Antimicrob Agents Chemother*, 55(5), 2212-2223. doi: 10.1128/AAC.01343-10

Sheppard, D. C. (2011). Molecular mechanism of *Aspergillus fumigatus* adherence to host constituents. *Curr Opin Microbiol*, 14(4), 375-379. doi: 10.1016/j.mib.2011.07.006

Singh, N. K., Blachowicz, A., Checinska, A., Wang, C. et Venkateswaran, K. (2016). Draft Genome Sequences of Two *Aspergillus fumigatus* Strains, Isolated from the International Space Station. *Genome Announc*, 4(4). doi: 10.1128/genomeA.00553-16

Slaven, J. W., Anderson, M. J., Sanglard, D., Dixon, G. K., Bille, J., Roberts, I. S. et Denning, D. W. (2002). Increased expression of a novel *Aspergillus fumigatus* ABC transporter

gene, *atrF*, in the presence of itraconazole in an itraconazole resistant clinical isolate. *Fungal Genet Biol*, 36(3), 199-206. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S1087-1845\(02\)00016-6](http://dx.doi.org/10.1016/S1087-1845(02)00016-6)

Snelders, E., Huis In 't Veld, R. A., Rijs, A. J., Kema, G. H., Melchers, W. J. et Verweij, P. E. (2009). Possible environmental origin of resistance of *Aspergillus fumigatus* to medical triazoles. *Appl Environ Microbiol*, 75(12), 4053-4057. doi: 10.1128/AEM.00231-09

Snelders, E., van der Lee, H. A., Kuijpers, J., Rijs, A. J., Varga, J., Samson, R. A., Mellado, E., Donders, A. R., Melchers, W. J. et Verweij, P. E. (2008). Emergence of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* and spread of a single resistance mechanism. *PLoS Med*, 5(11), e219. doi: 10.1371/journal.pmed.0050219

Staab, J. F., Balajee, S. A. et Marr, K. A. (2009). *Aspergillus* section *Fumigati* typing by PCR-restriction fragment polymorphism. *J Clin Microbiol*, 47(7), 2079-2083. doi: 10.1128/JCM.00551-09

Sugui, J. A., Kwon-Chung, K. J., Juvvadi, P. R., Latge, J. P. et Steinbach, W. J. (2014a). *Aspergillus fumigatus* and related species. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 5(2), a019786. doi: 10.1101/cshperspect.a019786

Sugui, J. A., Peterson, S. W., Figat, A., Hansen, B., Samson, R. A., Mellado, E., Cuenca-Estrella, M. et Kwon-Chung, K. J. (2014b). Genetic relatedness versus biological

compatibility between *Aspergillus fumigatus* and related species. *J Clin Microbiol*, 52(10), 3707-3721. doi: 10.1128/JCM.01704-14

Thywissen, A., Heinekamp, T., Dahse, H. M., Schmalder-Ripcke, J., Nietzsche, S., Zipfel, P. F. et Brakhage, A. A. (2011). Conidial Dihydroxynaphthalene Melanin of the Human Pathogenic Fungus *Aspergillus fumigatus* Interferes with the Host Endocytosis Pathway. *Front Microbiol*, 2, 96. doi: 10.3389/fmicb.2011.00096

Toyotome, T., Hagiwara, D., Kida, H., Ogi, T., Watanabe, A., Wada, T., Komatsu, R. et Kamei, K. (2017). First clinical isolation report of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* with TR34/L98H-type mutation in Japan. *J Infect Chemother*, 23(8), 579-581. doi: 10.1016/j.jiac.2016.12.004

Tsao, S., Rahkhoodaee, F. et Raymond, M. (2009). Relative contributions of the *Candida albicans* ABC transporters Cdr1p and Cdr2p to clinical azole resistance. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(4), 1344-1352. doi: 10.1128/AAC.00926-08

Tsao, S., Weber, S., Cameron, C., Nehme, D., Ahmadzadeh, E. et Raymond, M. (2016). Positive regulation of the *Candida albicans* multidrug efflux pump Cdr1p function by phosphorylation of its N-terminal extension. *J Antimicrob Chemother*, 71(11), 3125-3134. doi: 10.1093/jac/dkw252

Ullmann, A. J., Lipton, J. H., Vesole, D. H., Chandrasekar, P., Langston, A., Tarantolo, S. R., Greinix, H., Morais de Azevedo, W., Reddy, V., Boparai, N., Pedicone, L., Patino, H. et

- Durrant, S. (2007). Posaconazole or fluconazole for prophylaxis in severe graft-versus-host disease. *N Engl J Med*, 356(4), 335-347. doi: 10.1056/NEJMoa061098
- Urb, M., Pouliot, P., Gravelat, F. N., Olivier, M. et Sheppard, D. C. (2009). *Aspergillus fumigatus* induces immunoglobulin E-independent mast cell degranulation. *J Infect Dis*, 200(3), 464-472. doi: 10.1086/600070
- van der Linden, J. W., Snelders, E., Kampinga, G. A., Rijnders, B. J., Mattsson, E., Debets-Ossenkopp, Y. J., Kuijper, E. J., Van Tiel, F. H., Melchers, W. J. et Verweij, P. E. (2011a). Clinical implications of azole resistance in *Aspergillus fumigatus*, The Netherlands, 2007-2009. *Emerg Infect Dis*, 17(10), 1846-1854. doi: 10.3201/eid1710.110226
- Van Der Linden, J. W., Warris, A. et Verweij, P. E. (2011b). *Aspergillus* species intrinsically resistant to antifungal agents. *Med Mycol*, 49 Suppl 1, S82-89. doi: 10.3109/13693786.2010.499916
- Vermeulen, E., Maertens, J., Schoemans, H. et Lagrou, K. (2012). Azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation emerging in Belgium, July 2012. *Euro Surveill*, 17(48).
- Wiederhold, N. P., Gil, V. G., Gutierrez, F., Lindner, J. R., Albatineh, M. T., McCarthy, D. I., Sanders, C., Fan, H., Fothergill, A. W. et Sutton, D. A. (2016). First Detection of TR34 L98H and TR46 Y121F T289A Cyp51 Mutations in *Aspergillus fumigatus* Isolates in the United States. *J Clin Microbiol*, 54(1), 168-171. doi: 10.1128/JCM.02478-15

Wu, J., Zhang, Y., Xin, Z. et Wu, X. (2015). The crosstalk between TLR2 and NOD2 in *Aspergillus fumigatus* keratitis. *Mol Immunol*, 64(2), 235-243. doi: 10.1016/j.molimm.2014.11.021

Yaguchi, T., Horie, Y., Tanaka, R., Matsuzawa, T., Ito, J. et Nishimura, K. (2007). Molecular phylogenetics of multiple genes on *Aspergillus* section *Fumigati* isolated from clinical specimens in Japan. *Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi*, 48(1), 37-46. doi: 10.3314/jjmm.48.37

Annexe

Tableau A1. Pourcentage d'identité des gènes de pompes à efflux et des gènes métaboliques impliqués dans la résistance aux triazolés des isolats cryptiques d'*Aspergillus* section *Fumigati*.

Alias	Gène	Espèce ^a	Description	Pourcentage d'identité			
				<i>A. turcosus</i> HMR AF 23 (S) ^c	<i>A. turcosus</i> HMR AF 1038 (R) ^c	<i>A. thermomutatus</i> HMR AF 39 (R) ^c	<i>A. lentulus</i> IFM 54703T ^b (R) ^c
AFUA_1G10310	-	<i>A. fumigatus</i>	RNase L inhibitor of the ABC superfamily	92%	92%	91%	94%
AFUA_2G14020	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC transporter	88%	88%	86%	89%
AFUA_3G01400	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	89%	89%	88%	92%
AFUA_3G09680	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC efflux transporter	89%	89%	90%	92%
AFUA_4G01050	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	86%	86%	85%	90%
AFUA_4G14130	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	86%	86%	85%	89%
AFUA_5G00790	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	87%	87%	0%	90%
AFUA_5G02260	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	88%	88%	89%	92%
AFUA_5G07970	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC metal ion transporter	90%	90%	90%	95%
AFUA_5G09460	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC transporter	90%	90%	90%	93%
AFUA_5G09480	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC transporter	89%	89%	89%	92%
AFUA_5G10510	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC transporter	0%	0%	82%	88%
AFUA_6G03080	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	85%	86%	0%	89%

AFUA_6G08020	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC transporter	87%	87%	87%	92%
AFUA_7G06760	-	<i>A. fumigatus</i>	CRAL/TRIO domain protein	82%	82%	83%	87%
AFUA_8G02650	-	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	0%	0%	87%	92%
AFUA_1G17440	<i>abcA</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC drug exporter	79%	79%	92%	90%
AFUA_1g10390	<i>abcB</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	89%	89%	88%	91%
AFUA_1G14330	<i>abcC/cdr1B/ abcG1</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC transporter	92%	92%	91%	95%
AFUA_6G03470	<i>abcD</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	0%	0%	0%	89%
AFUA_7g00480	<i>abcE</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	86%	86%	85%	92%
AFUA_6G07280	<i>adp1</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC transporter	91%	91%	90%	95%
AFUA_5g06070	<i>Afu MDR1</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter Mdr1	91%	91%	91%	94%
AFUA_4g10000	<i>Afu MDR2</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter Mdr2	90%	90%	89%	93%
AFUA_3g03500	<i>Afu MDR3</i>	<i>A. fumigatus</i>	MFS multidrug transporter	85%	84%	80%	84%
AFUA_1g12690	<i>Afu MDR4</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter Mdr4	92%	92%	90%	93%
AFUA_2G15130	<i>Afu2g15130</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC	92%	92%	92%	96%
AFUA_4G14760	AFUA_ 92.m00226	<i>A. fumigatus</i>	ABC, pseudogene	0%	0%	0%	0%
AFUA_6G09930	<i>Afyap1</i>	<i>A. fumigatus</i>	transcription factor	87%	87%	88%	92%
AFUA_6G12870	<i>atm1</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC iron exporter	91%	91%	90%	94%
AFUA_4g08800	<i>atrD</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC a-pheromone efflux pump AtrD	87%	87%	87%	91%
AFUA_6G04360	<i>atrF</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC drug exporter AtrF	91%	91%	90%	94%
AFUA_3G03670	<i>atrH</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	0%	0%	87%	89%

AFUA_3G07300	<i>atrI</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	91%	91%	91%	95%
AFUA_2G02690	<i>atrR</i>	<i>A. fumigatus</i>	Fungal specific transcription factor	91%	91%	91%	94%
CaO19.6000	<i>CDR1</i>	<i>C. albicans</i>	ABC transporter	0%	0%	0%	0%
CaO19.5958	<i>CDR2</i>	<i>C. albicans</i>	multidrug resistance ABC transporter	0%	0%	0%	0%
CaO19.5079	<i>CDR4</i>	<i>C. albicans</i>	potential ABC transporter	0%	0%	0%	0%
AF338659	<i>cyp51a</i>	<i>A. fumigatus</i>	Lanosterol 14 α -demethylase	87%	87%	88%	90%
AF338660	<i>cyp51b</i>	<i>A. fumigatus</i>	Lanosterol 14 α -demethylase	88%	88%	89%	93%
AFUA_4G04820	<i>erg25A</i>	<i>A. fumigatus</i>	Putative: C-4 methyl oxidase	0%	91%	91%	94%
AFUA_3G12400	<i>ganA</i>	<i>A. fumigatus</i>	G protein complex alpha subunit	91%	91%	90%	94%
AFUA_6G05300	<i>hapE</i>	<i>A. fumigatus</i>	DNA-binding subunit of the Hap-complex	92%	92%	92%	97%
AFUA_2G03700	<i>hmg1</i>	<i>A. fumigatus</i>	HMG-CoA reductase	90%	90%	90%	93%
AFUA_1G11230	<i>hmg2</i>	<i>A. fumigatus</i>	HMG-CoA reductase- Isoform of <i>hmg1</i>	0%	0%	85%	90%
AFUA_8G04840	<i>hrdA</i>	<i>A. fumigatus</i>	Stimulate UPR- Ring finger protein	90%	90%	89%	94%
AFUA_5G04170	<i>Hsp90</i>	<i>A. fumigatus</i>	Heat stress chaperon	96%	96%	94%	96%
AFUA_2G03090	<i>htm1</i>	<i>A. fumigatus</i>	Vacuolar ABC heavy metal transporter	91%	91%	92%	94%
CaO19.5604	<i>MDR1</i>	<i>C. albicans</i>	Major Facilitator Transporter	0%	0%	0%	0%
AFUA_1G13800	<i>mdrA</i>	<i>A. fumigatus</i>	MFS multidrug transporter	89%	89%	91%	94%
AFUA_1G05010	<i>MFS56</i>	<i>A. fumigatus</i>	MFS multidrug transporter	85%	85%	84%	87%
AFUA_8g05710	<i>mfsA/Stl1</i>	<i>A. fumigatus</i>	MFS sugar transporter Stl1	0%	0%	91%	91%
AFUA_1g03200	<i>mfsC</i>	<i>A. fumigatus</i>	MFS transporter	0%	0%	0%	90%
AFUA_1G05800	<i>Mkk2</i>	<i>A. fumigatus</i>	Cell wall integrity- MAP kinase kinase	91%	91%	92%	93%
AFUA_3G03430	<i>sitT</i>	<i>A. fumigatus</i>	ABC multidrug transporter	0%	0%	88%	89%

AFUA_2G01260	<i>SrbA</i>	<i>A. fumigatus</i>	Sterol response element binding protein	89%	89%	90%	93%
AFUA_2G09960	<i>ssc70</i>	<i>A. fumigatus</i>	Mitochondrial Hsp70 chaperone	93%	93%	93%	95%

^a Les gènes d'*A. fumigatus* proviennent de la souche référence AF293. Les gènes de *C. albicans* proviennent de la souche de référence SC5314.

^b De **Kusuya Y, Sakai K, Kamei K, Takahashi H, Yaguchi T.** 2016. Draft genome sequence of the pathogenic filamentous fungus *Aspergillus lentulus* IFM 54703T. *Genome Announc* 2016 Jan 14;4(1). pii: e01568-15. doi: 10.1128/genomeA.01568-15.

^c (S), sensible aux triazolés; (R), résistant aux triazolés