UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

université angers

Thèse de Doctorat

Cindy STAERCK

Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université d'Angers
sous le sceau de l'Université Bretagne Loire

École doctorale : Biologie-Santé

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

Soutenue le 13 Décembre 2017
Thèse N° : *(10)*

Etude de la réponse au stress oxydatif de *Scedosporium apiospermum,* un champignon filamenteux associé à la mucoviscidose

JURY

Rapporteurs :	**Marie-Claire MACHOUART**, Professeur des Universités- Praticien Hospitalier, Université de Lorraine **Michel CHIGNARD,** Professeur émérite, Sorbonne Université
Examinateurs :	**Marie-Elisabeth BOUGNOUX,** Maitre de Conférence des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris-Descarte **Loïc FAVENNEC**, Professeur des Universités- Praticien Hospitalier, Université de Rouen
Directeur de Thèse :	**Jean-Philippe BOUCHARA**, Professeur des Universités- Praticien Hospitalier, Université d'Angers
Co-encadrant de Thèse :	**Maxime FLEURY**, Maitre de Conférence des Universités, Université d'Angers

Etude de la réponse au stress oxydatif chez *Scedosporium apiospermum,* un champignon filamenteux associé à la mucoviscidose

Mémoire présenté en vue de l'obtention du ***grade de Docteur de l'Université d'Angers*** *sous le sceau de l'Université Bretagne Loire*

École doctorale : Biologie-Santé

Discipline : Microbiologie

Spécialité : Microbiologie

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

STAERCK Cindy

Sous la direction du Pr. Jean-Philippe BOUCHARA
Avec le co-encadrement du Dr. Maxime FLEURY

Membres du jury

Rapporteurs :
MACHOUART Marie-Claire | Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Lorraine
CHIGNARD Michel | Professeur émérite, Sorbonne Université

Examinateurs :
BOUGNOUX Marie-Elisabeth | Maitre de Conférences des Universités-Praticien Hospitaliers, Université Paris-Descartes
FAVENNEC Loïc | Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université de Rouen

Soutenu publiquement le :
13 décembre 2017

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :

- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français : http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/

Ces conditions d'utilisation (attribution, pas d'utilisation commerciale, pas de modification) sont symbolisées par les icônes positionnées en pied de page.

Remerciements

Après trois ans de thèse, ce chapitre arrive à sa fin. Trois ans de travail, de moments difficiles, mais surtout fait de bons moments, et de rencontre. Trois années au cours desquelles j'ai appris tant professionnellement qu'humainement. Ce travail n'aurait jamais été possible sans les conseils d'un grand nombre d'acteurs que je tiens à remercier en quelques mots.

Tout d'abord, je souhaite remercier ***Madame le Professeur Marie-Claire MACHOUART*** *et* ***Monsieur le Professeur Michel CHIGNARD*** *d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail et d'y avoir consacré du temps.*

Je remercie également ***Madame le Docteur Marie-Elisabeth BOUGNOUX*** *et* ***Monsieur le Professeur Loïc FAVENNEC*** *d'avoir accepté d'examiner ce travail.*

Je remercie ***Monsieur le Professeur Jean-Philippe BOUCHARA*** *d'avoir dirigé cette thèse, pour ses conseils ainsi que pour l'autonomie et l'indépendance qu'il m'a accordé au cours de ce travail.*

Je remercie également ***Monsieur le Docteur Maxime FLEURY*** *qui m'a encadré au cours de mon stage de master 2 et au cours de ma thèse. Merci pour ta disponibilité (même les soirs, les weekend), tes conseils tout au long de cette thèse et ton soutien. Merci pour tes blagues, il faut l'avouer pas toujours drôles. Merci également à ta famille pour sa patience au cours de ces années.*

Madame le Docteur Florence ROBERT-GANGNEUX *et* ***Monsieur le Docteur Thomas GUILLEMETTE*** *pour avoir accepté de faire partie de mon comité de suivi de thèse et pour leurs conseils judicieux au cours des présentations. Merci également au* ***Docteur Thomas GUILLEMETTE*** *pour ses conseils lors de l'analyse par LASER néphélométrie du mutant SOD.*

Je remercie également les membres du ***GEIHP***, ***Adeline***, ***Agnès***, ***Amandine***, ***Anaïs***, ***Bénédicte***, ***Charlotte***, ***Julia***, ***Julie***, ***Laetitia***, ***Marc***, ***Maxime P***, ***Nathalie***, ***Nicolas***, ***Patrick***, ***Sandrine***, ***Tatiana***, ***Yohann*** *et* ***Wilfried*** *pour leur bienveillance, leur bonne humeur, leur sympathie.*

Dans le laboratoire, il y a une personne sans qui rien ne serait possible : ***Patrick****. Je te remercie pour tes nombreux conseils, comme nous le disions avec Anaïs il y a la pratique et il y a la Patrick. J'espère sincèrement que ta situation va se pérenniser.*

Monsieur le Professeur Nicolas PAPON*, je vous remercie pour vos relectures sur nos articles, et vos recommandations.*

Sandrine*, je te remercie pour tes précieux conseils, et ton aide pour l'analyse des résultats de néphélométrie du mutant.*

Wilfried*, je te souhaite beaucoup de courage pour ta thèse, et encore merci pour ton aide pour l'évaluation de l'activité de l'auranofin !!*

Charlotte, ***Julia****, je vous remercie sincèrement pour votre aide tout au long de cette thèse. Cette thèse a été rendu possible entre-autre grâce à votre aide. Un grand merci à Charlotte pour ton aide (ta « quasi »*

exploitation) pour la réalisation des ELISA et surtout des dilutions des sérums. Je souhaite également remercier **Corentin** *qui lors de son remplacement, a été d'un grand secour, et efficace pour les manips visant à étudier les phénotypes du mutant.*

Je tiens à remercier tout particulièrement **Amandine** *pour toute ton aide, notamment pour la production des cassettes de délétion par PCR fusion. Merci de m'avoir encadré, conseillé au cours de ces 2 années de DCACE à l'IUT. Merci également d'avoir été présente, de m'avoir soutenu moralement surtout au cours de ces derniers mois.*

Julie, *de la team trottinette, un grand merci pour ta présence au cours de ces trois années de thèse, merci pour les nombreux muffins et notre programmation de spectacles qui nous a permis de découvrir Faye-d'Anjou, Savarry… On a fait de belles découvertes au cours cette dernière année, qui m'ont permis de m'aérer. Un jour, on arrivera à voir Vérino. Je croise les doigts pour la suite !!!*

Anaïs, *toi qui me demandais si tu étais dans mes remerciements, comme s'il était possible que tu n'y sois pas !!! Ça a été un plaisir de t'avoir comme voisine de bureau pendant 2 ans, merci pour les bonbons, les craquages, ton soutien… Maintenant tu es la doyenne (la vieille doctorante) du laboratoire… Ne change pas ! Je croise les doigts pour toi, tes mutants, et tes futurs projets professionnels (choisi bien ton post-doc, que je puisse venir en vacances) et personnels.*

Ce travail n'aurait pas été possible sans l'aide des petites mains, que j'ai plus ou moins exploité : **Margaux**, **Daisy**, **Gift**, **Clémence**, **James**, **Mélanie**, **Ophélie**, **Andrew**, **Laure**. *Je remercie particulièrement* **Clémence** *qui lors de son stage volontaire a permis le développement de l'étude sur la germination, et* **Ophélie** *qui a abattu un travail considérable durant son stage.*

Je tiens à remercier les personnes avec qui j'ai eu l'honneur de travailler.

Madame le Docteur Anne LANDREAU *avec qui j'ai pu continuer et valoriser mes travaux de Master.*

Je remercie grandement **Madame le Docteur Julie TABIASCO** *et* **Monsieur le Docteur Sènan D'ALMEIDA** *pour leur collaboration, leur sympathie, leur enthousiasme, leur disponibilité, et leur aide technique pour les cocultures. Je garde un très bon souvenir de nos manips!!!*

Je remercie également l'équipe pédagogique de l'IUT d'Angers, et principalement Mesdames **Séverine VALETTE** *et* **Fabienne MABILLEAU** *avec qui j'ai pu travailler au cours de ces 2 années de DCACE. Merci pour vos conseils et pour cette opportunité qui fut très enrichissante professionnellement et humainement.*

Je tiens également à remercier mes nouveaux collègues de l'équipe **U2RM** *de l'Université de Caen, pour leur accueil, leur bienveillance, et leurs conseils avisés.*

Comment ne pas remercier mes amis (de très longue date pour certains), qui ont été d'un soutien sans faille, et qui arrive à me supporter.

***Jo** et **sa petite famille**, 16 ans maintenant qu'on se connait, 16 ans d'une amitié qui survie à tout, 16 ans qu'on rigole des mêmes choses. Malgré la distance rien n'a changé. J'espère être maintenant plus disponible pour venir en vacances, que je puisse discuter de nouveau « entre adulte » avec **Kylou**, qu'on retrouve nos habitudes de petites vieilles, et surtout profiter de la petite famille qui grandi beaucoup trop vite.*

***Julien**, même si l'on se voit peu, merci pour les moments passés ensembles et nos discussions.*

***Jemina**, merci d'avoir été là, de me faire rire depuis 5 ans (déjà 5 ans que j'essaye de me débarrasser de toi) avec tes expressions made in Jemina. Un jour on arrivera organiser un weekend avec la petite bande du master, mais ce ne sera pas à « Angers, ça vend du rêve » comme l'a dit le « représentant masculin » du groupe.*

***Arnaud**, comme tu me l'as dit : « Tu pourras me remercier pour mon « soutien » moral dans ta thèse », c'est maintenant chose faite. Merci de répondre toujours présent pour me remotiver, et pour tes conseils ~~toujours~~ rarement pertinents et judicieux. Tu as été d'un grand soutien au cours de ces années, même si tu manges toujours quand j'appelle, et si tu es tout le temps en vacances…*

*Je tiens pour finir à remercier particulièrement **ma famille** pour leur présence même en étant à l'autre extrémité de la France, qui ont entendu parler de ma thèse très très très souvent. Merci d'avoir supporté mes absences, mes semi-présences. Promis j'arrête là les études, il n'y en aura pas d'autres. Je souhaite particulièrement remercier **Tata Isa**, **Chris** et **Hélène** (on va enfin pouvoir aller en Angleterre !!!), **Momo**, et **Alex**. Je suis également obligée de remercier **LE tonton Lionel** pour l'ensemble de son œuvre depuis ma naissance, mais surtout pour m'assurer de conserver mon droit de vacances et une immunité à vie (?). MERCI à **mes parents** qui m'ont soutenu dans mes choix, et fais confiances, merci de m'avoir permis de faire ces études. Merci à ma sœur, **Elodie**, qui a accepté de relire cette thèse.*

Je souhaite remercier tout particulièrement les associations Vaincre La Mucoviscidose et Grégory Lemarchal pour leur soutien financier, sans qui cette thèse et ces travaux n'auraient jamais pas été possible.

Merci à toutes les personnes qui ont contribué à ce travail, que j'ai pu rencontrer, avec qui j'ai pu discuter. J'espère n'avoir oublié personne dans ces remerciements, si tel était le cas, je vous prie d'accepter mes excuses.

Sommaire

ABREVIATIONS **1**

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX **5**

INTRODUCTION **9**

ANALYSE BIBLIOGRAPHIQUE **13**

1. La mucoviscidose **15**
1.1. Historique 16
1.2. Le gène CFTR et les mutations associées à la mucoviscidose 17
1.3. La protéine CFTR et ses fonctions 20
1.4. Physiopathologie et manifestations cliniques 22
1.5. Les voies de recherche dans le traitement de la mucoviscidose 24
1.6. La colonisation des voies respiratoires et les infections respiratoires au cours de la mucoviscidose 27

2. Les espèces du genre *Scedosporium* **37**
2.1. Morphologie de ces champignons 37
2.2. Taxonomie 40
2.3. Ecologie 41
2.4. Les scédosporioses 46
2.5. Facteurs de pathogénicité 50
2.6. Méthodes de détection 53
2.7. Traitement d'une scédosporiose 55

3. Le stress oxydatif **57**
3.1. ROS et RNS dans la réponse immunitaire 57
3.2. Les systèmes antioxydants enzymatiques des pathogènes 58
3.3. Le stress oxydatif et la mucoviscidose 78
3.4. Utilisation d'inhibiteurs enzymatiques comme agents antimicrobiens 80

OBJECTIFS **93**

TRAVAIL EXPERIMENTAL **97**

1. Etude de la germination en condition de stress oxydatif chimique **99**
2. Etude de l'expression de la catalase A1 et de la Cu/Zn superoxyde dismutase de *S. boydii* en condition de stress oxydatif **123**
3. Analyse bio-informatique des génomes de *Scedosporium* **139**
4. Etude de la réponse au stress oxydatif chez *S. apiospermum* **157**
5. Construction de mutants défectifs de gènes de détoxification des ROS chez *Scedosporium apiospermum* **189**
6. Utilisation d'inhibiteurs d'enzymes de détoxification des ROS comme antifongiques vis-à-vis des *Scedosporium* **217**
7. Standardisation du sérodiagnostic des scédosporioses **227**

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES **237**

CONCLUSION **251**

BIBLIOGRAPHIE **255**

Abréviations

AA : Acide Arachidonique

ABC transporteur : *ATP Binding Cassette*

ABPA : Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique

ABPM : Mycose Broncho-Pulmonaire Allergique

ADN : Acide DésoxyRibonucléique

ADNc : Acide DésoxyRibonucléique complémentaire

ADP : Adénosine DiPhosphate

AMPc : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AP : *Associated Protein*

ARNm : Acide RiboNucléique messager

ARNt : Acide RiboNucléique de transfert

ATCC : *American Type Culture Collection*

ATP : Adénosine TriPhosphate

BLRZ : Domaine *basic leucine zipper*

b-TUB : Tubuline

BT2 : β-Tubuline

b*ZIP* : *Basic leucine zipper*

CAT : Catalase

CATA1 : Catalase A1 de *S. boydii*

CCL2 : Cytokine de type chimiokine

CCP : Cytochrome C Peroxydase

c-CRD : Domaine riche en cystéine en position C-terminale

CDS : *coding DNA sequence*

CF : *Cystic fibrosis*

CFTR : *Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*

CI_{50} : Concentration inhibant 50% de la croissance

CI_{80} : Concentration inhibant 80% de la croissance

CI_{90} : Concentration inhibant 90% de la croissance

CLSI : *Clinical Laboratory Standards Institute*

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

CPO : Chloroperoxydase

CRISPR : *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*

Ct : C*ycle threshold*

Cu/Zn SOD : Cuivre Zinc superoxyde dismutase

DETA NO : Diéthylènetriamine/ monoxyde d'azote

DHA : Acidedocohexaénoïque

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EA : Equipe d'accueil

EC : *Enzyme Commission numbers*

ECMM : *European Confederation of Medical Mycology*

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

ELISA : *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*

ENaC : *Epithelial Na+ channel*

ERA : Espèce Réactive Azotée

ERO : Espèce Réactive Oxygénée

FAD : Flavine Adénine Dinucléotide

Fe SOD : Fer superoxyde dismutase

FHB : Flavohémoglobine

FIC : *Fractional Inhibitory Concentration*

FRI-CR : *Working group interim report Fungal Respiratory Infections in Cystic Fibrosis*

GIC_{75} : Concentration inhibant 75% de la germination

GliT : Thiorédoxine réductase d'*Aspergillus fumigatus*

GPI : ancre glycosylphosphatidylinositol

GPX : Glutathion peroxydase

GR : Glutathion réductase

GRX : Glutarédoxine

GRX-$(SH)_2$: Glutarédoxine réduite

GRX-S_2 : Glutarédoxine oxydée

GSH : Glutathion réduit

GSSG : Glutathion oxydé

GST : Glutathion transférase

H_2O_2 : Peroxyde d'hydrogène

HEPES : Acide 4-(2-hydroéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique

HL60 : Lignée humaine de promyélocytes

HPH : Gène de résistance à l'hygromycine

IFN-γ : Interferon γ

IHEM : *Institute of Hygiene and Epidemiology - Mycology section*

IL1β : Interleukine 1 β

IL6 : Interleukine 6

IL12 : Interleukine 12

IL23 : Interleukine 23

iNOS : Nitric oxyde synthase inductible

ISHAM : *International Society for Human and Animal Mycology*

ITS : *Internal Transcribed Spacer*

kDA : kilodalton

LASER: *Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation*

LB : *Luria-Broth*

LPS : LipoPolySaccharide

LTs : *Leukotriens*

M : Concentration molaire (mol/L)

MALDI-TOF : *Matric Assisted Laser Desorption Ionisation – Time Of Flight*

mM : Concentration molaire (mmol/L)

Mn SOD : Manganèse superoxyde dismutase

MOPS : Acide 3-(N-morpholino)propanesulfonique

MPO : Myélopéroxydase

$NADP^+$: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate

$NADPH,H^+$: Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate, Hydrogène

NBD : *Nucleotide Binding Domain*

n-CRD : Domaine riche en cystéine en position N-terminale

NH_3 : Ammonium

Ni SOD : Nickel superoxyde dismutase

NiR : Nitrite réductase

NO: Monoxyde d'azote

NO_3^- : Nitrate

NO_2^- : Nitrite

Nox : NADPH oxydase

NR : Nitrate réductase

Nrf2 : *Nuclearfactor (erythroid-derive 2) like*

O_2 : Dioxygène

$O_2^{\circ-}$: Anion superoxyde

pAN7.1 : Plasmide pAN7.1 porteur de la résistance à l'hygromycine

PCR : *Polymerase chain reaction*

PDA : Potatoe-Dextrose-Agar

PEG : PolyEthylène Glycol

pGPDA : Promoteur du gène codant la glycéraldéhyde-3-phosphate d'*Aspergillus nidulans*

PGs : Prostaglandines

PHGPX : Phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase

Prot-$(SH)_2$: Protéine réduite

Prot-S_2 : Protéine oxydée

PRX : Peroxyrédoxine

R-Cl : Résidu chloré

RH : Résidu

R-$(SH)_2$: Résidu réduit

RNS : *Reactive Nitrogen Species*

ROH : Alcool

ROOH : hydroperoxyde

ROS : *Reactive Oxygen Species*

Rpm : Rotation par minute

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute Medium*

RQ : *Relative quantification*

R-S_2 : Résidu oxydé

RT-PCR : PCR en temps réel

SARM : *Staphylococcus aureus* méthicilline résistant

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SOD : SuperOxyde Dismutase

SODC : Cu/Zn superoxyde dismutase cytosolique de *S. boydii*

STC : Tampon composé de Tris-HCl, $CaCl_2$, et sorbitol pour préparation des protoplastes

TAE : Tampon Tris-Acétate-EDTA

TALEN : *TransActivator Like Effector Nuclease*

termTRPC : Terminateur du gène indole-3-glycérolphosphate synthase *d'A. nidulans*

THP1 : Lignée humaine monocytaire

TLR4 : *Toll-Like-Receptor 4*

TM : Domaine transmembranaire

TNF-α : *Tumor Necrosis Factor* α

TRX : Thiorédoxine

TRX-S_2 : Thiorédoxine oxydée

TRX-$(SH)_2$: Thiorédoxine réduite

TRXR : Thiorédoxine réductase

UA : Université d'Angers

UFC : Unité Formant Colonie

UTR : *UnTranslated Region*

UV : Ultra-Violet

WT : *Wild-Type*

YAP : Y*es Associated Protein*

YPD : Yeast-Peptone-Dextrose

YPDA : Yeast-Peptone-Dextrose-Agar

ZFN : *Zinc Finger Nuclease*

ΔF508 : Délétion de la phénylalanine en position 508

Liste des figures et tableaux

Liste des figures

Figure 1 : Evolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose en France depuis 1992. 15
Figure 2 : Prévalence de la mucoviscidose par département 16
Figure 3 : Localisation chromosomique et organisation du gène CFTR. 17
Figure 4 : Répartition des mutations sur le gène CFTR. 18
Figure 5 : Classification des mutations du canal CFTR 20
Figure 6 : Structure de la protéine CFTR. 20
Figure 7 : Mécanisme d'ouverture du canal CFTR 22
Figure 8 : Mécanisme d'altération du mucus et de la fonction pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose 24
Figure 9 : Thérapies développées pour le traitement de la mucoviscidose 27
Figure 10 : Fréquence d'isolement des bactéries et des *Aspergillus* à partir des expectorations de patients atteints de mucoviscidose en fonction de l'âge. 29
Figure 11 : Macroscopie des espèces du genre *Scedosporium* 37
Figure 12 : Morphologie microscopique de *S. apiospermum* après coloration au bleu lactique (grossissement X 400) 38
Figure 13 : Corémies du stade Graphium sur une souche de *S. apiospermum* (coloration au bleu lactique ; grossissement X 100). 39
Figure 14 : Cléistothèces de *S. boydii* (A), libérant des ascospores après rupture (B) 39
Figure 15 : Phylogénie des *Scedosporium* basé sur l'analyse des séquences du locus TUB du gène de la β-tubuline 42
Figure 16 : Fréquence d'isolement des espèces du genre *Scedosporium* dans les sols Autrichiens et Néerlandais 44
Figure 17 : Fréquence des *Scedosporium* dans l'ouest de la France en fonction des types de sols 45
Figure 18 : Répartition des espèces du genre *Scedosporium* dans l'ouest de la France en fonction des types de sols 45
Figure 19 : Comparaison de la réponse à *P. aeruginosa* par les macrophages de patients sains vs. patients atteints de mucoviscidose 79
Figure 20 : Carte de restriction du plasmide pAN7.1 utilisé pour la production des cassettes de délétion par clonage. 194
Figure 21 : Construction des cassettes de délétion par PCR fusion. 198
Figure 22 : Principe de la transformation par recombinaison homologue 201
Figure 23 : Alignement des domaines protéiques b*ZIP*, n-CRD et c-CRD des facteurs de transcription Yap1. 204
Figure 24 : Analyse électrophorétique des produits d'amplification des extrémités 5'UTR et 3'UTR 205
Figure 25 : Analyse électrophorétique des produits de PCR fusion. 206

Figure 26 : Colonies des transformants obtenus pour le gène *CDS9352* codant le facteur de transcription SaYap1. 207
Figure 27 : Analyse par Southern blot des clones obtenus après transformation de la souche IHEM 14462:Ku70Δ avec la cassette de délétion du gène *CDS9352*. 207
Figure 28 : Colonies des transformants obtenus pour le gène *CDS3212* codant la Cu/Zn-SOD à ancre GPI. 208
Figure 29 : Taille des fragments attendus pour la souche parentale et le mutant pour le gène *CDS3212*. 209
Figure 30 : Analyse par Southern blot des transformants SaSOD3212 A1, A2, A3, A4 obtenus après transformation pour le gène *CDS3212*. 209
Figure 31 : Croissance de la souche parentale et des mutants sur milieu PDA après 3 jours d'incubation à différentes températures. 210
Figure 32 : Croissance en présence de rouge Congo (3 jours d'incubation) 210
Figure 33 : Cinétique de croissance du mutant SaΔSOD3212 et de la souche parentale évaluée par LASER néphélométrie. 211
Figure 34 : Cinétique de croissance de la souche parentale (A) et du mutant SaΔSOD3212 (B) en présence de ménadione 25 µM. 211
Figure 35 : Aspect des spores de la souche parentale (A-F) et du mutant SaΔSOD3212 (G-L) en microscopie électronique à transmission. 212
Figure 36 : Dimensions (longueur A, largeur B) et épaisseur de la paroi (C) des spores dormantes de la souche parentale (SaKu70Δ) et du mutant (SaΔSOD3212). 212

Liste des tableaux

Tableau I : Activité antimicrobienne de l'auranofin et ses cibles 84
Tableau II : Activité antiparasitaire de l'auranofin et ses cibles 85
Tableau III : Activité antimicrobienne de l'ebsélen et ses cibles chez les bactéries, levures et champignons filamenteux 88
Tableau IV : Activité antiparasitaire de l'ebsélen et ses cibles 89
Tableau V : Activité antiparasitaire de la conoïdine A et ses cibles 89
Tableau VI : Ascomycètes présentant un homologue de Yap1 de *S. cerevisiae* et phénotypes étudiés..192
Tableau VII : Amorces utilisées pour la construction des cassettes de délétion par clonage. 197
Tableau VIII : Amorces utilisées pour la PCR fusion. 199
Tableau IX : Homologies entre les séquences protéiques déduites des orthologues de Yap1 chez les *Scedosporium* 204
Tableau X : Activité de l'auranofin et de l'ebsélen comparée à celle du voriconazole et du posaconazole sur différents isolats de *Scedosporium*. 223
Tableau XI : Interactions entre l'auranofin et le voriconazole aux CI_{50} 224
Tableau XII : Interactions entre l'auranofin et le posaconazole aux CI_{50}.....225
Tableau XIII : Interactions entre l'auranofin et le posaconazole aux CI_{80} 226

Introduction

Les espèces du genre *Scedosporium* sont des champignons filamenteux habituellement saprophytes. Ces champignons retrouvés dans les environnements pollués (Harun *et al.* 2010; Rougeron *et al.* 2015) se comportent chez l'homme et l'animal comme des pathogènes opportunistes, et sont à l'origine d'une grande variété d'infections survenant chez des patients immunodéprimés comme chez des individus immunocompétents. Ils peuvent être à l'origine d'infections localisées chroniques sous-cutanées (mycétomes), oculaires, articulaires ou osseuses, mais aussi d'infections disséminées à partir d'un foyer généralement pulmonaire (Husain *et al.* 2005; Guarro *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2008; Borghi *et al.* 2010; Oliveira *et al.* 2013; Cruz *et al.* 2015; Huguenin *et al.* 2015; Chen *et al.* 2016; Denton *et al.* 2016). De plus, ils sont fréquemment isolés des expectorations de patients atteints de mucoviscidose. Ils sont aujourd'hui reconnus dans tous les pays comme des pathogènes émergents dans le contexte de la mucoviscidose. Ils se situent, en termes de fréquence, au deuxième rang parmi les champignons filamenteux colonisant les voies respiratoires des patients, après *Aspergillus fumigatus.* La prévalence de ces champignons varie d'une étude à l'autre, notamment en fonction de la population étudiée et de la zone géographique, mais aussi des milieux d'isolement utilisés. Les différentes études indiquent une prévalence comprise entre 2% et 17,4% (Cimon *et al.* 1995, 2000b; Pihet *et al.* 2008; Blyth *et al.* 2010a; Manso *et al.* 2011; Kramer *et al.* 2015; Ziesing *et al.* 2016). En France, les principales espèces associées à la mucoviscidose sont *Scedosporium boydii,* suivi de *Scedosporium apiospermum* (Zouhair *et al.* 2013). Ces pathogènes sont responsables la plupart du temps de colonisation asymptomatique des voies respiratoires, mais ils peuvent également déterminer des bronchites, ainsi que des mycoses broncho-pulmonaires allergiques comparables à celles induites par *A. fumigatus* (Cimon *et al.* 2000a; Vázquez-Tsuji *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2008). La colonisation par ces espèces est cependant préoccupante si une transplantation pulmonaire est envisagée, en raison de l'immunodépression induite et de la faible sensibilité de ces champignons aux antifongiques. Plusieurs cas cliniques ont d'ailleurs été rapportés d'infections disséminées, souvent létales, survenues à la suite d'une transplantation chez des patients atteints de mucoviscidose (Symoens *et al.* 2006; Sahi *et al.* 2007; Borghi *et al.* 2010; Morio *et al.* 2010; Hirschi *et al.* 2012; Gonzalez-Garcia *et al.* 2017)

L'identification de ces champignons passe par la recherche du pathogène dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose. Cette recherche se fait par culture sur des milieux gélosés, et par examen histologique des biopsies collectées dans les formes invasives. Récemment des milieux sélectifs ont été développés pour les espèces du genre *Scedosporium*, permettant d'inhiber certains champignons filamenteux à croissance rapide comme *A. fumigatus,* et facilitant ainsi la détection des *Scedosporium* (Rainer *et al.* 2008; Pham *et al.* 2015). Associées à l'examen mycologique classique, plusieurs méthodes moléculaires ont été développées pour permettre la détection de *Scedosporium* directement dans les expectorations des patients (Castelli *et al.* 2008; Bouchara *et al.* 2009; Harun *et al.* 2011; Lu *et al.* 2011). Ces méthodes ne permettent pas de différencier les colonisations, pour lesquels aucun traitement ne doit être mis en place, des infections qui nécessitent une prise en charge thérapeutique. La différence entre colonisation et infection repose sur la mise en évidence d'anticorps sériques (IgG et/ou IgM) dirigés contre *Scedosporium* qui sont retrouvés en cas d'infection et absents lors d'une colonisation ou d'une

sensibilisation (Baxter *et al.* 2013). La détection d'anticorps dirigés contre *Scedosporium* est déjà réalisée dans un petit nombre de laboratoires spécialisés par électrosynérèse à partir d'extraits antigéniques bruts de *Scedosporium* (Cimon *et al.* 2000b). Cependant cette technique manque de standardisation et peut être à l'origine de faux positifs dus à des réactions croisées avec *A. fumigatus*. Il est donc nécessaire de développer un outil de diagnostic des infections à *Scedosporium* qui soit sensible et spécifique, mais aussi parfaitement standardisé, afin de faciliter la décision thérapeutique.

Jusqu'à un passé très récent, peu de données étaient disponibles sur les mécanismes de pathogénicité de ces champignons, en raison notamment de l'absence de données génomiques. Le séquençage du génome d'un isolat clinique de *S. apiospermum* en 2014 (Vandeputte *et al.* 2014), puis celui d'un isolat environnemental de *S. aurantiacum* en 2015 (Pérez-Bercoff *et al.* 2015), et plus récemment d'un isolat clinique de *S. boydii* (Duvaux *et al.* 2017) permettent d'envisager des progrès plus rapides. De plus une étude de génomique comparative actuellement conduite au laboratoire permettra d'établir s'il existe des différences génomiques entre les espèces du genre *Scedosporium*.

L'une des approches dans la compréhension des mécanismes de pathogénicité passe par l'étude de l'échappement aux défenses immunitaires de l'hôte, en particulier au stress oxydatif induit par les neutrophiles et macrophages qui libèrent des espèces réactives oxygénées (ERO ou ROS) ou azotées (ERA ou RNS) en réponse aux pathogènes. La réponse au stress oxydatif a été longuement étudiée chez différents pathogènes, les données disponibles dans la littérature montrent qu'il existe des systèmes antioxydants enzymatiques ou non enzymatiques. Parmi les antioxydants enzymatiques, plusieurs systèmes interviennent dans la dégradation des ROS, comme les superoxyde dismutases (SODs), les catalases (CAT), les enzymes des systèmes glutathion et thiorédoxine et diverses peroxydases, et celle des RNS comme les flavohémoglobines, nitrate réductases, et nitrite réductases. En participant à la détoxification des ROS induits chimiquement ou produits par les cellules phagocytaires, certaines de ces enzymes jouent chez d'autres agents infectieux un rôle important dans l'échappement du pathogène à la réponse immune et la virulence. Une meilleure connaissance de ces enzymes permettrait donc de mieux comprendre les mécanismes développés par les *Scedosporium* pour se protéger des défenses immunitaires de l'hôte. Par ailleurs, des applications diagnostiques ou thérapeutiques pourraient être envisagées.

Analyse bibliographique

1. La mucoviscidose

La mucoviscidose, nommée aussi fibrose kystique (Cystic Fibrosis, ou CF) est la maladie autosomique récessive la plus fréquente dans la population caucasienne. En France, la mucoviscidose touche 1 enfant sur 4300, et une personne sur 25 porte une mutation à l'origine de cette maladie (Bellis *et al*. 2016). D'après le registre français de la mucoviscidose, 6585 patients atteints de la mucoviscidose étaient recensés en 2015, avec 46,3% d'enfants et 53,7% d'adultes (Bellis *et al.* 2016). La mise en place du dépistage néonatal depuis 2002 en France a permis une meilleure prise en charge des patients. Le nombre de nouveaux cas diagnostiqués par an est estimé à 150-200, dont les deux tiers sont diagnostiqués grâce au dépistage néonatal (Burgel 2016). Les progrès dans le traitement et la prévention des infections respiratoires joints à l'amélioration du statut nutritionnel des patients et à l'accès aux greffes, ont permis une augmentation de l'espérance de vie, qui se traduit par une proportion accrue de patients adultes, de 18,7% en 1992 à 53,7% en 2015 **(Figure 1)** (Bellis *et al.* 2016). D'après une étude prospective sur l'évolution de la population, cette augmentation de la population adulte devrait se poursuivre, puisqu'on attend pour 2025 une proportion de 75,7% d'adultes parmi les patients atteints de mucoviscidose (Burgel *et al.* 2015).

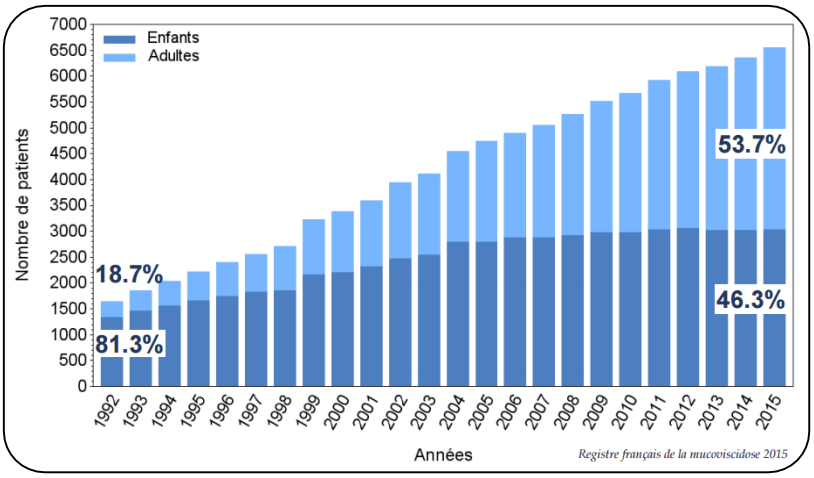


Figure 1: Evolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose en France depuis 1992, d'après Bellis *et al.* (2016).

La mucoviscidose affecte indifféremment les deux sexes, avec une répartition de 51,2% d'hommes et 47,9% de femmes d'après les données de 2015 en France. La prévalence de la mucoviscidose est variable d'une région à l'autre avec des régions à forte prévalence comme la Bretagne, le département de la Haute-Corse, la Lorraine, la région Auvergne-Rhône-Alpes et La Réunion **(Figure 2)** (Bellis *et al.* 2016). Bien que le gène responsable de cette maladie ait été identifié en 1989 (Riordan *et al.* 1989; Rommens *et al.* 1989), et en dépit de différents essais thérapeutiques, il n'existe pas de traitement curatif (Amaral 2015; Durupt *et al.* 2016; De Boeck et Amaral 2016). Cependant l'amélioration de la prise en charge des patients a permis une augmentation la qualité de vie des patients et une diminution du taux de mortalité, passant de 12,5/1000 en 2006 à 6,2/1000 en 2015 (Bellis *et al.* 2016).

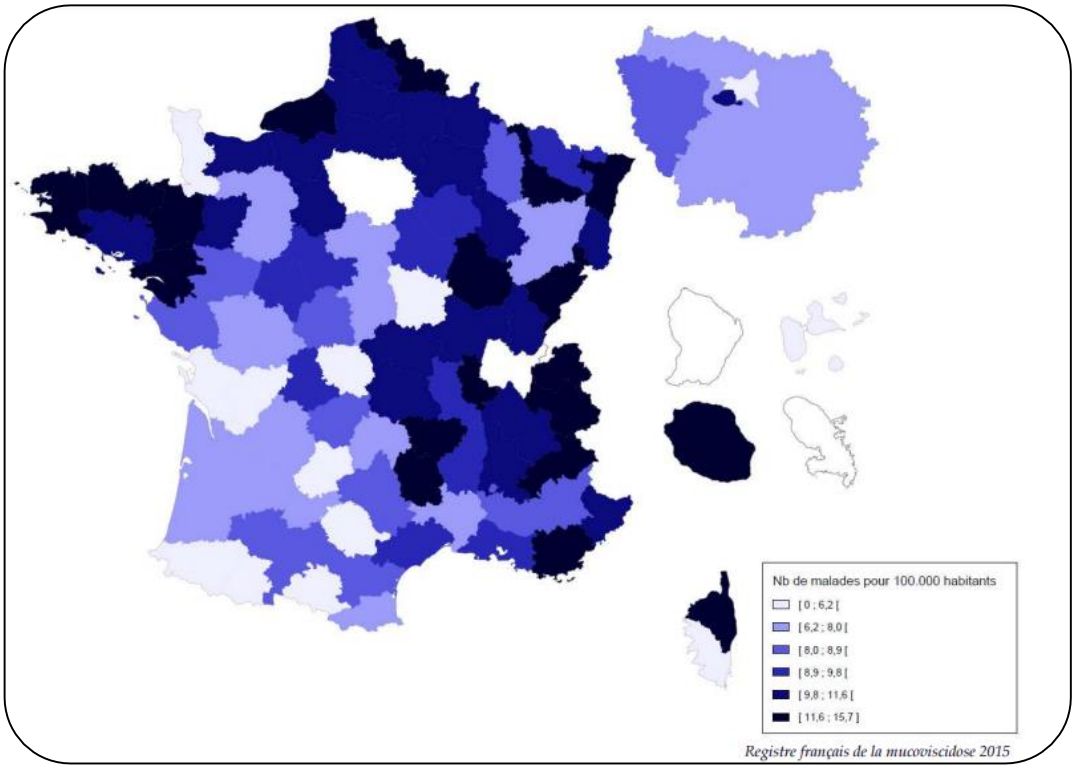


Figure 2: Prévalence de la mucoviscidose par département, d'après Bellis *et al.* (2016).

La mucoviscidose est due à des mutations du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*), ce gène code un canal chlore portant le même nom (Riordan *et al.* 1989). Les mutations du gène *CFTR* entraînent un dysfonctionnement de la protéine correspondante au niveau des membranes cellulaires, d'importance variable selon le type de mutation, ou son absence, avec pour conséquence une diminution de la sécrétion des ions chlorure. Cette diminution de sécrétion est corrélée à une absorption anormalement élevée des ions sodium, entraînant une déshydratation du mucus, notamment au niveau pulmonaire. Le mucus respiratoire devient plus visqueux et est plus difficilement évacué avec pour conséquence une obstruction des voies respiratoires. Cet encombrement bronchique entraîne une inflammation chronique renforcée par les colonisations/infections par différents microorganismes. Cette inflammation conduit progressivement à une destruction de l'appareil respiratoire qui aboutit au décès du patient en l'absence de transplantation pulmonaire (Boyle et De Boeck 2013; Amaral 2015; Durupt *et al.* 2016; De Boeck et Amaral 2016; Elborn 2016).

1.1. Historique

La mucoviscidose est connue depuis le Moyen-âge, mais elle fût réellement décrite comme fibrose kystique du pancréas et bronchectasie seulement en 1936 par le docteur Fanconi. En 1938, Andersen fit le lien entre une sueur riche en ions chlorure et la maladie, avec la découverte d'obstruction des canaux glandulaires. Mais bien avant cette description, un lien avait été établi entre la forte teneur en ions chlorure de la sueur des enfants et une maladie entraînant une mortalité précoce. Le terme de mucoviscidose a été utilisé la première fois en 1943 par Farber, en raison de la présence d'un « mucus visqueux »

particulièrement épais au niveau de canaux glandulaires. L'aspect héréditaire de la maladie a été décrit quelques années plus tard par Andersen et Hodges. Dans les années 1950, di Sant'Agnese *et al.* (1953a,b) montrèrent que les enfants atteints de cette maladie présentaient un taux de chlorures dans la sueur 5 fois plus élevé que la normale, ce qui permit la mise en place du test de la sueur. Trente ans plus tard, Quinton et Bijman (1983) ont montré un défaut de perméabilité aux ions chlorure au niveau des cellules épithéliales, ce qui a été confirmé pour l'épithélium pulmonaire par Knowles *et al.* (1983). Au cours des années 80, des études ont montré qu'il existait un lien entre l'absorption des ions sodium et la mucoviscidose (Boucher *et al.* 1986). Le gène responsable de la maladie a quant à lui été identifié et isolé en 1985 et 1989, respectivement (Riordan *et al.* 1989; Rommens *et al.* 1989).

1.2. Le gène *CFTR* et les mutations associées à la mucoviscidose

1.2.1. Le gène *CFTR*

Le gène *CFTR* code un canal chlore ATP-dépendant. Il est localisé sur le bras long du chromosome 7, au niveau du segment q31.2 (Kerem *et al.* 1989; Riordan *et al.* 1989; Rommens *et al.* 1989). Ce gène présente une séquence de 250 kb divisée en 27 exons **(Figure 3)** (Riordan *et al.* 1989; Rommens *et al.* 1989; Romey 2006).

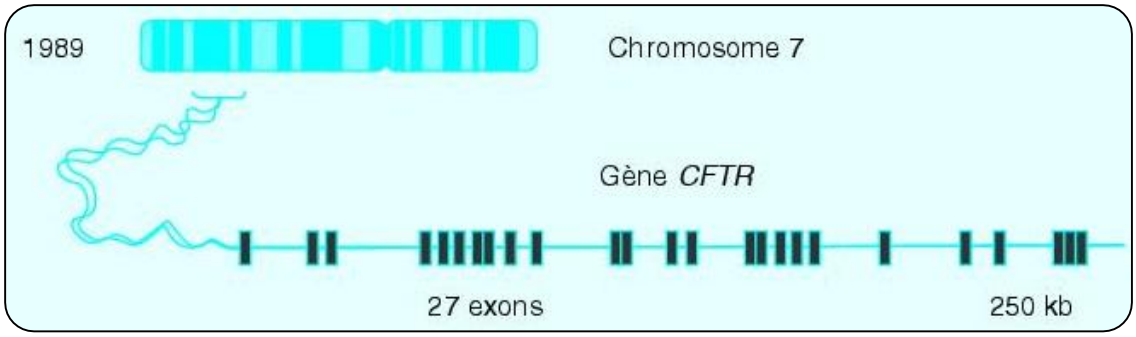


Figure 3: Localisation chromosomique et organisation du gène *CFTR*, d'après Romey *et al.* (2006).

1.2.2. Les mutations du gène *CFTR*

Depuis l'identification du gène codant la protéine CFTR, 2019 mutations ont été identifiées sur la séquence nucléotidique (http://www.genet.sickkids.on.ca). Il s'agit en majorité de mutations faux sens (39,46%), mais des insertions/délétions entraînant un décalage du cadre de lecture sont également décrites (15,62%), de même que des variations de séquences (13,34%), des altérations du processus d'épissage (11,30%), des mutations non-sens (8,38%), des insertions/délétions ne modifiant pas le cadre de lecture (2,58%), des grands réarrangements (2,08%), ou encore des mutations au niveau du promoteur (0,74%) **(Figure 4)**.

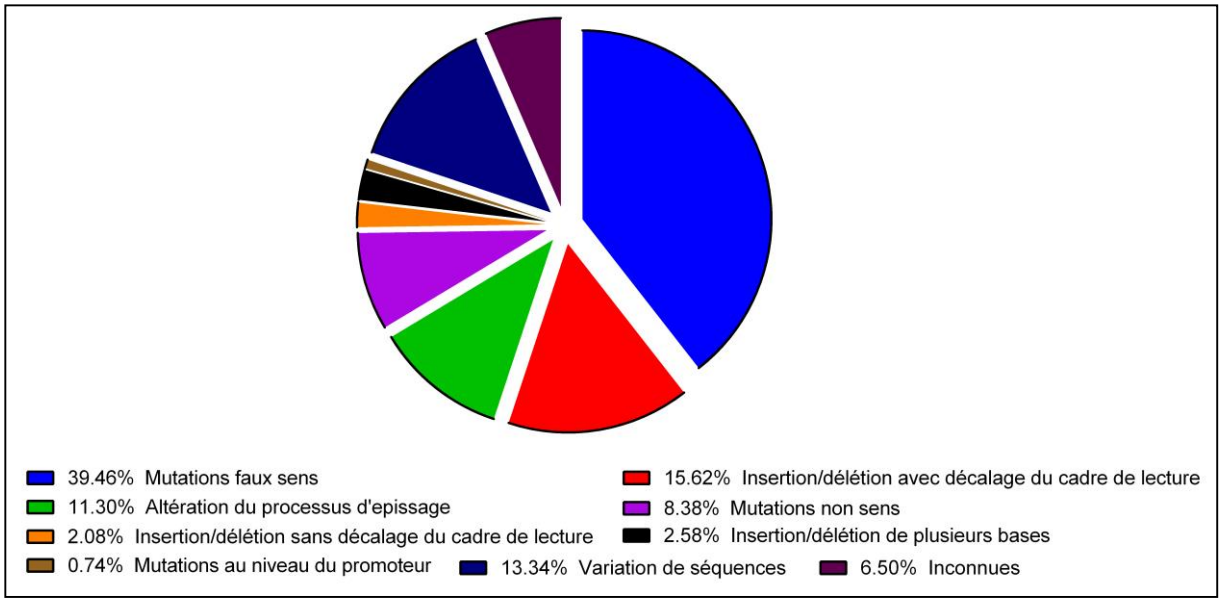


Figure 4: Répartition des mutations sur le gène *CFTR*, d'après la *Cystic Fibrosis Mutation Database*.

Ces mutations sont réparties en 6 classes, avec trois types d'effet sur la protéine CFTR ou son fonctionnement (Boyle et De Boeck 2013; Amaral 2015; De Boeck et Amaral 2016; Elborn 2016).

En l'absence de mutation, la protéine est transcrite, puis traduite à partir du gène *CFTR*. La protéine formée va être adressée à la membrane plasmique, plus précisément au pôle apical de la cellule. Certaines mutations, comme les mutations de classe I et II, vont entraîner une absence de la protéine CFTR au niveau de la membrane **(Figure 5)**.

Les mutations de classe I entraînent un défaut de synthèse de la protéine CFTR, par l'introduction d'un codon stop à l'origine de la formation d'un ARNm tronqué et/ou d'insertions/délétions provoquant un décalage du cadre de lecture. Les protéines non fonctionnelles ainsi produites sont rapidement dégradées. Parmi les mutations les plus connues, on peut citer les mutations c.1624G>T (p.Gly542X, aussi appelée G542X), c.3846G>A (p.Trp1282X, aussi appelée W1282X), c.1657C>T (p.Arg553X ou R553X) et 621+1G→T.

Les mutations de classe II génèrent un défaut de maturation de la protéine CFTR et de son transport intracellulaire. Il s'agit principalement de mutations faux-sens qui entraînent des délétions d'acides aminés. Ces mutations ne vont pas affecter le transcrit, mais la protéine synthétisée au niveau du réticulum endoplasmique va être sensible aux protéases, puisque sa conformation va empêcher sa glycosylation. Les protéines CFTR synthétisées par ces patients vont s'accumuler dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi où elles vont être dégradées. Les principales mutations appartenant à cette classe, sont la délétion du résidu phénylalanyl en position 508 (c.1521_1523del ; p.Phe508del, ou F508del), la délétion de l'isoleucine en position 507 (c.1519_1521delATC ; p.Ile507del), et les mutations c.3909C>G (p.Asn1303Lys, ou N1303K) et c.1679G>C (p.Arg560Thr ou R560T). La mutation F508del est la plus fréquemment associée à la mucoviscidose ; en France elle est retrouvée chez 83,3% des patients

atteints de mucoviscidose, et 41,9% des patients sont hétérozygotes pour cette mutation (Bellis *et al.* 2016).

D'autres mutations vont quant à elles entraîner un dysfonctionnement de la protéine CFTR. La protéine CFTR est présente, mais non ou peu fonctionnelle. Deux classes de mutations sont en cause : les mutations de classe III et celles de classe IV **(Figure 5)**.

Les mutations de classe III entraînent un défaut de régulation de l'activité de la protéine CFTR. Cette protéine est un canal chlore ATP-dépendant régulé par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation au niveau des domaines de fixation et d'hydrolyse de l'ATP. En cas de mutations de classe III, l'ATP est incapable de se fixer, ce qui empêche l'ouverture du canal chlore et le passage des ions chlorure vers le milieu extracellulaire. Les mutations associées à cette classe induisent des substitutions d'acides aminés, les plus fréquentes sont les mutations Gly551Asp, Gly178Arg, Gly551Ser, et Ser549Asn.

Les mutations de classe IV affectent la stabilité de la protéine en diminuant la conductance ou la sélectivité du canal chlore, ou en impactant les mécanismes d'ouverture/fermeture. Ces mutations sont pour la plupart associées aux domaines transmembranaires qui participent à la formation du canal. Contrairement aux mutations précédentes, elles n'affectent pas la fixation de l'ATP. Les plus fréquentes intéressent les acides aminés 117, 334 ou 347 (Arg117His, Arg347Pro, Arg117Cys, et Arg334Trp par exemple).

Un troisième groupe est formé par les mutations des classes V et VI, qui se traduisent par une diminution du nombre de canaux CFTR au niveau de la membrane apicale de la cellule **(Figure 5)**.

Les mutations de classe V diminuent la synthèse protéique. Ces mutations ont le plus souvent lieu au niveau du promoteur du gène *CFTR*, elles réduisent sa transcription et la stabilité des transcrits. Ces mutations vont entraîner un épissage alternatif du transcrit et un défaut de transport de la protéine jusqu'à la membrane. Il s'agit le plus souvent de mutations faux-sens qui altèrent le processus d'épissage, comme la mutation 5T qui introduit un polymorphisme au niveau de l'intron 8 du gène *CFTR* responsable d'un épissage anormal. On retrouve dans cette classe les mutations suivantes 3849+10kbC→T, 2789+5G→A, et 3120+1G→A.

La dernière classe de mutations est la classe VI. Ces mutations, relativement rares, entraînent une diminution de la stabilité de la protéine CFTR, à l'origine d'une dégradation rapide de la région C-terminale de la protéine. Il s'agit le plus souvent de mutations faux-sens, avec pour conséquence des substitutions d'acides aminés comme les mutations 4326delTC, Gln1412X et 4279insA.

Comparées aux mutations de classe IV et V, les mutations appartenant aux trois premières classes induisent un déficit plus sévère de la protéine CFTR, en diminuant la quantité de protéines fonctionnelles. Enfin, certaines mutations peuvent être affectées à plusieurs classes.

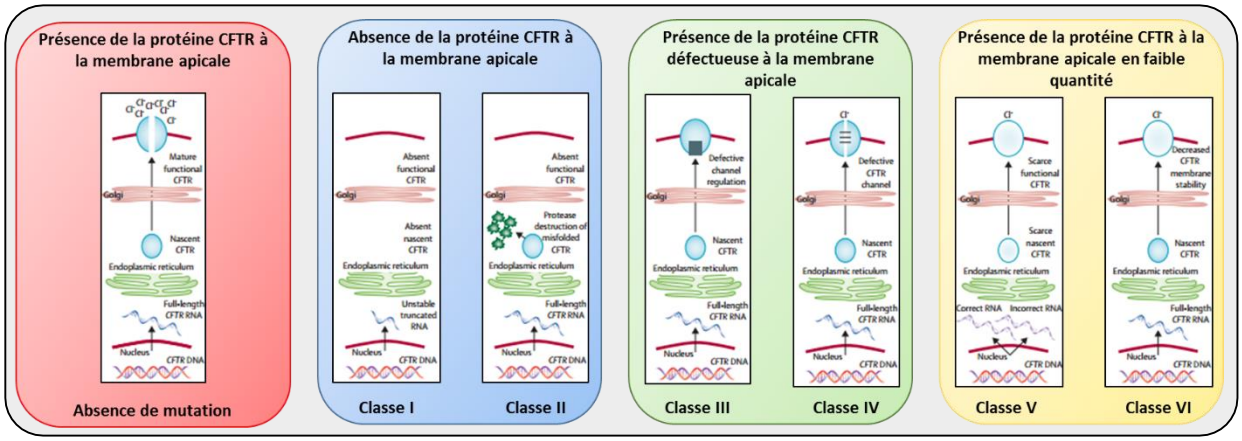


Figure 5: Classification des mutations du canal CFTR, d'après Boyle et de Boeck (2013)

1.3. La protéine CFTR et ses fonctions

1.3.1. Structure

La protéine CFTR est une glycoprotéine membranaire de 170 kDa, comportant 1480 acides aminés (Riordan *et al.* 1989). Elle est retrouvée au niveau de la membrane apicale des épithéliums sécrétoires de différents organes. Sa structure a été décrite en 1989 par Riordan *et al*. Cette protéine monomérique appartient à la famille des transporteurs ABC (ATP-binding cassette). Elle présente une symétrie avec deux motifs similaires entourant le domaine R (domaine régulateur cytoplasmique). Ces deux motifs comportent chacun un domaine transmembranaire (TM) constitué de 6 hélices hydrophobes responsables de la formation du pore et d'une région cytoplasmique hydrophile comprenant les sites de fixation et de clivage de l'ATP (domaines NBD1 et NBD2, pour Nucleotide Binding Domains). Ces deux motifs sont liés au domaine R, exposant des résidus séryl phosphorylables par la protéine kinase A (AMPc-dépendante) à la surface du domaine R **(Figure 6)** (Romey 2006).

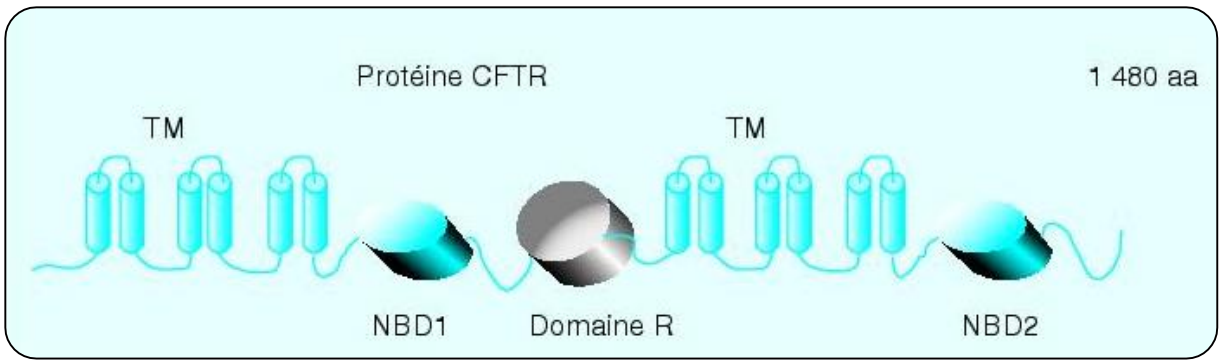


Figure 6: Structure de la protéine CFTR, d'après Romey *et al.* (2006).

1.3.2. Localisation cellulaire

La protéine CFTR est localisée au pôle apical des cellules de l'épithélium de glandes exocrines (et dans les vésicules intracytoplasmiques avant d'être insérée dans la membrane apicale). Cette protéine est exprimée au niveau de nombreux épithéliums du système digestif comme les canaux pancréatiques (Boom *et al.* 2007), hépatiques ou biliaires, les cryptes intestinales et les glandes salivaires. Elle l'est aussi au niveau du système urogénital, notamment au niveau des canaux déférents, de l'épididyme et des cellules du tube distal du rein (Morales *et al.* 2000; Jouret *et al.* 2011). Le gène codant la protéine CFTR est aussi exprimé au niveau des épithéliums du système respiratoire, notamment par les cellules bronchiques comme les cellules ciliées des bronches proximales ou distales, les cellules de canaux collecteurs glandulaires et les cellules glandulaires séreuses, au niveau des cellules bronchiolaires et des cellules alvéolaires telles que les pneumocytes de type II (Kreda *et al.* 2005, 2012).

Certains tissus non-épithéliaux sont capables d'exprimer le gène *CFTR* comme les lymphocytes (Yoshimura *et al.* 1991), l'hypothalamus (Mulberg *et al.* 1998; Reznikov 2017), les muscles lisses (Robert *et al.* 2004; Hays *et al.* 2005; Guo *et al.* 2014), ou encore le cœur (Labombarda *et al.* 2016). Il est également exprimé chez les macrophages et les neutrophiles (Nichols et Chmiel 2015 ; Bruscia et Bonfield 2016 ; Levêque *et al*. 2017)

1.3.3. Fonctions

La fonction de canal chlore fut mise en évidence par Riordan *et al*. en 1989. Bien qu'étant appelé canal chlore, la sélectivité de la protéine CFTR pour les ions chlorure, due aux acides aminés constituant les domaines transmembranaires, n'est pas absolue. La protéine CFTR laisse aussi passer d'autres anions monovalents comme les anions bicarbonate. C'est un canal bidirectionnel participant à l'import et l'export d'ions (Riordan *et al.* 1989; Gadsby *et al.* 2006).

Les deux domaines TM1 et TM2 représentent le pore du canal, le domaine R permet de maintenir la fermeture du canal. Dans le compartiment intracellulaire, l'augmentation du taux d'AMPc induit la phosphorylation de la protéine kinase A du domaine R sur les résidus séryl. Dans un même temps, la fixation de l'ATP sur les domaines cytoplasmiques NBD1 et NBD2 induit un changement de conformation de la protéine permettant l'ouverture du canal chlore et le passage de ces ions. L'ouverture du canal chlore est maintenue jusqu'à l'hydrolyse de la molécule d'ATP sur NBD2. L'hydrolyse de la seconde molécule d'ATP par des phosphatases entraîne un affaiblissement de la liaison entre les deux domaines NBD1-NBD2 induisant la désactivation et la fermeture du canal chlore **(Figure 7)** (Gadsby *et al.* 2006).

La protéine CFTR exerce de nombreuses autres fonctions comme la régulation de nombreux canaux. Elle stimulerait certaines glycoprotéines comme les mucines impliquées dans la protection de la surface des cellules épithéliales et régulerait la synthèse et la sécrétion de cytokines inflammatoires.

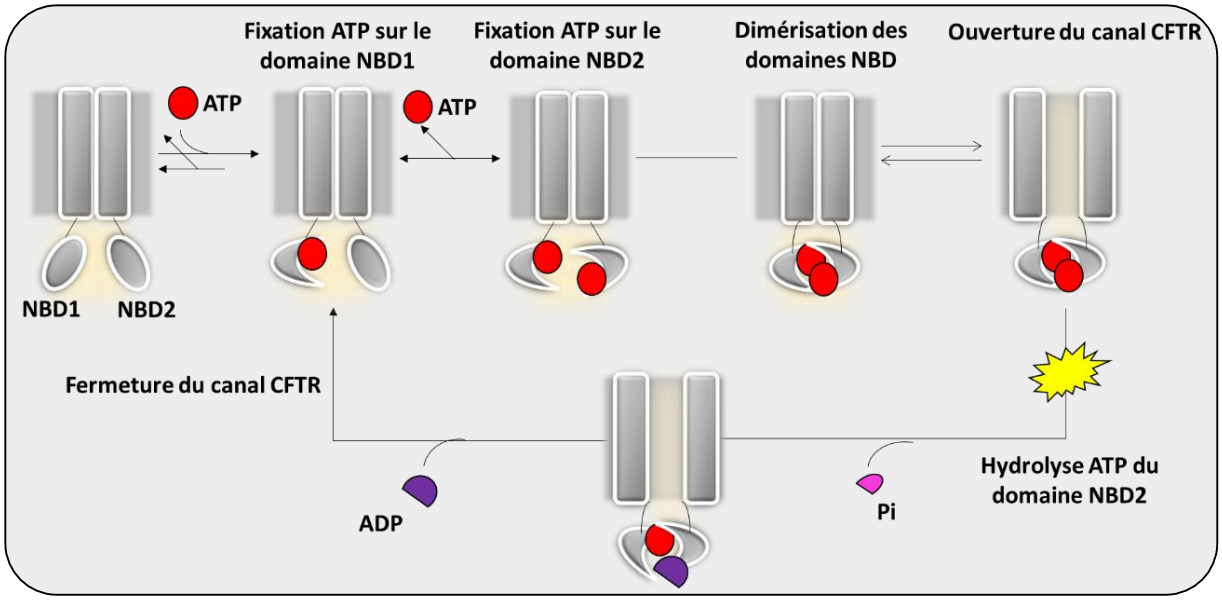


Figure 7: Mécanisme d'ouverture du canal CFTR, d'après Gadsby *et al.* (2006)

1.4. Physiopathologie et manifestations cliniques

En raison de l'expression du gène *CFTR* dans de nombreux épithéliums, la mucoviscidose affecte différents organes : la peau, le système digestif, l'appareil uro-génital et les voies respiratoires. La sévérité de la maladie est liée à la classe de mutation, mais aussi aux facteurs environnementaux. Les patients atteints de mucoviscidose présentent un tableau clinique variable, même pour des mutations identiques. Ces données suggèrent l'influence de facteurs héréditaires et environnementaux sur le phénotype de la maladie (Cutting 2015).

1.4.1. Atteintes du système digestif

La mucoviscidose entraîne un déséquilibre en ions au niveau des cellules de l'épithélium et une déshydratation pouvant aboutir à une obstruction, voire une atrophie des canaux sécréteurs. 80% des patients atteints de mucoviscidose présente une insuffisance pancréatique, due à l'absence de neutralisation par les sucs pancréatiques de l'acidité du contenu gastrique. Ce pH acide est à l'origine d'une incapacité à digérer les protéines, lipides et glucides par les enzymes pancréatiques qui ne sont actives qu'à pH alcalin. En raison de la viscosité et de l'obstruction des canaux pancréatiques, les enzymes ne se sont pas délivrées au niveau intestinal ; elles restent au niveau du pancréas et vont être à l'origine d'autodigestion et de fibroses. Associé à cette pathologie, il a été démontré que les patients atteints de mucoviscidose étaient sujets à développer un diabète insulino-dépendant ou encore des cirrhoses hépatiques (Munck 2005; Bush 2006; Assis et Freedman, 2016; Elborn 2016).

Des études ont montré qu'à la naissance, les nouveau-nés atteints de mucoviscidose présentaient un retard d'émission du méconium, voire un iléus méconial. En grandissant les patients peuvent développer une stéatorrhée et des problèmes nutritionnels associés à une mauvaise digestion des aliments et une malabsorption des nutriments avec, notamment, des carences en graisses et en protéines, mais aussi en

vitamines liposolubles telles que les vitamines A, D, E et K. Associé à ces problèmes nutritionnels, les patients peuvent souffrir d'anorexie, de douleurs abdominales chroniques et de constipation résultant notamment d'une sécrétion intestinale insuffisante (Bush 2006; Assis et Freedman 2016; Elborn 2016).

1.4.2. Atteintes du revêtement cutané

Il est bien connu que la mucoviscidose affecte le revêtement cutané, puisque très tôt dans l'histoire cette maladie a été associée à la présence d'un taux élevé de NaCl dans la sueur. Cette forte teneur en NaCl est retrouvée chez 98% des patients et est due à l'absence complète ou partielle de réabsorption des ions Na^+ et Cl^- chez les patients. Cette particularité a été utilisée pour le développement du test de la sueur. Les données disponibles dans la littérature indiquent en moyenne une concentration en NaCl dans la sueur de 100 mM, avec une grande hétérogénéité des valeurs allant de 60 à 160 mM. Il est à noter que dans 2% des cas, la mucoviscidose n'est pas associée à une augmentation de la teneur en NaCl de la sueur, ce qui retarde le diagnostic de la maladie (Vankeerberghen *et al.* 2002).

1.4.3. Atteintes de l'appareil uro-génital

La mucoviscidose est associée à une diminution de la fertilité, surtout chez les hommes. En effet chez ces derniers, la mutation du gène *CFTR* entraine une azoospermie obstructive résultant d'une atrophie, d'une fibrose ou encore de l'absence de canaux déférents. Un retard de puberté a aussi été rapporté, puisque le canal CFTR est impliqué dans la modulation de la sécrétion de la gonadolibérine. Chez les hommes atteints de mucoviscidose, la paternité est majoritairement associée à une aide à la procréation d'après le registre français de la mucoviscidose. Les femmes sont le plus souvent fertiles, bien que des diminutions de la fertilité soient parfois observées, dues à la présence d'un mucus cervical anormalement visqueux (Vankeerberghen *et al.* 2002; Bellis *et al.* 2016; Elborn 2016). Le registre français de la mucoviscidose rapportait en 2015, un taux de conception pour 1000 femmes de 15 à 49 ans passant de 22 à 39,5 de 2006 à 2014 (Bellis *et al.* 2016).

1.4.4. Atteintes du système respiratoire

Les atteintes du système respiratoire, notamment des poumons, sont bien documentées en raison de la comorbidité et de la mortalité qui leur sont associées. Les patients atteints de mucoviscidose naissant avec des poumons normaux vont développer rapidement une inflammation des voies respiratoires en raison de l'accumulation de neutrophiles, d'interleukine 8, mais aussi de différentes protéines inflammatoires. La mutation du gène *CFTR* entraîne au niveau pulmonaire un défaut de sécrétion des ions Cl^- corrélé à une réabsorption d'ions Na^+ **(Figure 8)**. Afin de réguler l'osmolarité de part et d'autre des membranes plasmiques, de l'eau est réabsorbée ce qui aboutit à une déshydratation du mucus bronchique. Il en résulte un épaississement et une accumulation du mucus, limitant la clairance muco-ciliaire et favorisant l'installation des microorganismes inhalés **(Figure 8)**. Ce mucus particulièrement épais est à l'origine d'obstruction et d'une inflammation chronique. Cette inflammation est exacerbée par les infections respiratoires et conduit à la destruction progressive du tissu pulmonaire, à l'origine d'une insuffisance respiratoire **(Figure 8)**. Associés à la mucoviscidose, des pneumothorax et hémoptysies ont été décrits. A

un stade avancé, la dégradation de la fonction pulmonaire nécessite une transplantation pulmonaire ou cœur-poumons (Amaral 2015; Elborn 2016).

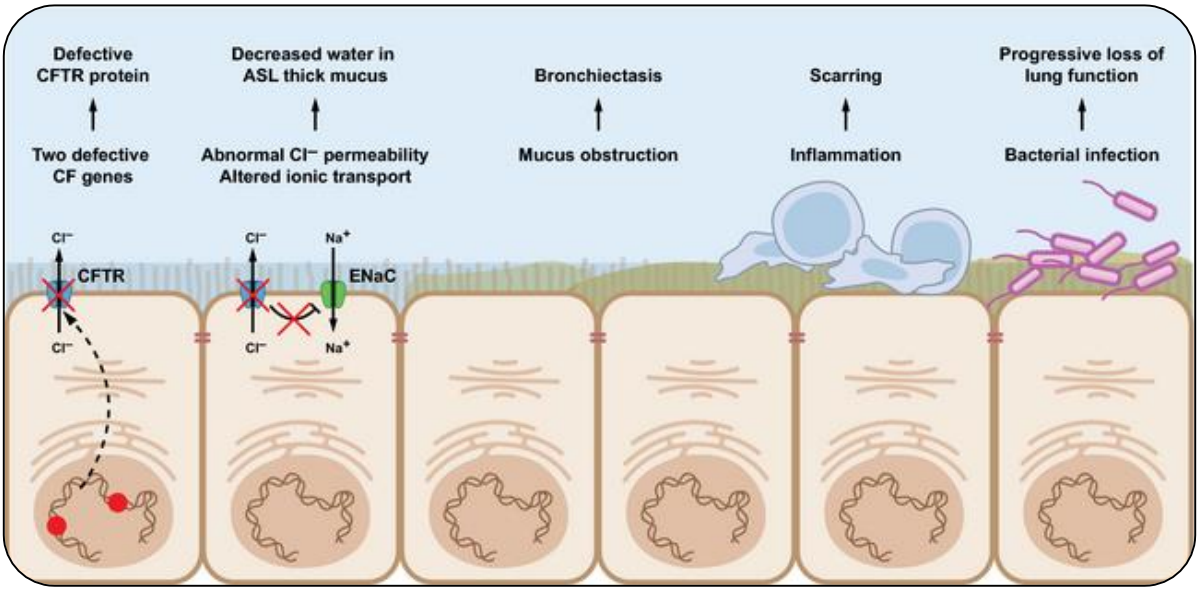


Figure 8: Mécanisme d'altération du mucus et de la fonction pulmonaire chez les patients atteints de mucoviscidose, d'après Amaral (2015)

1.5. Les voies de recherche dans le traitement de la mucoviscidose

L'amélioration de la prise en charge des patients et le développement des transplantations d'organes, mais aussi le traitement des infections associées à la mucoviscidose, ont permis une augmentation importante de l'espérance de vie. Jusqu'à un passé très récent, les traitements étaient purement symptomatiques, avec notamment la kinésithérapie respiratoire pour faciliter l'expectoration, la prise de bronchodilatateurs ou encore l'administration d'antibiotiques. Dans un souci d'amélioration du statut nutritionnel, les patients reçoivent des compléments alimentaires ainsi qu'une supplémentation en enzymes pancréatiques. Néanmoins, ces traitements ralentissent seulement la progression de la maladie et la destruction du tissu pulmonaire, et la transplantation reste la seule alternative à un stade avancé de la maladie.

Depuis quelques années, de nouvelles approches thérapeutiques sont étudiées, consistant en :

- la modulation des mécanismes cellulaires impliqués dans l'hydratation du mucus,
- l'amélioration de la prise en charge des infections,
- la compréhension des mécanismes de défense et le contrôle de l'inflammation,
- la correction du gène *CFTR* et/ou des effets associés aux mutations.

1.5.1. La modulation des mécanismes cellulaires impliqués dans l'hydratation du mucus

Plusieurs systèmes de modulation des mécanismes cellulaires impliqués dans l'hydratation du mucus ont été développés au cours de ces dernières années. Ils mettent en jeu des agents osmotiques comme des solutions hypertoniques salées ou encore du mannitol. D'autres utilisent des activateurs augmentant le nombre de canaux chlorure calcium-dépendants dans la membrane plasmique, ou stimulant leur ouverture. Des protéases ont été développées, ainsi que des composés bloquant les canaux sodiques épithéliaux ENaC et l'entrée des ions sodium dans la cellule, et donc indirectement la déshydratation du mucus (Amaral 2015; Durupt *et al.* 2016; De Boeck et Amaral 2016; Elborn 2016).

1.5.2. L'amélioration de la prise en charge des infections

Le développement de nouveaux antibiotiques plus efficaces, mais aussi l'adaptation des posologies, ou encore l'utilisation de molécules induisant une séquestration du fer ou inhibant le quorum-sensing, sont autant de voies de recherche qui, jointes à l'analyse du profil de résistance des microorganismes, devraient permettre une meilleure prise en charge des infections, avec comme objectif une moindre dégradation clinique et fonctionnelle et une réduction de la fréquence des exacerbations (Sherrard *et al.* 2014; Amaral 2015; Durupt *et al.* 2016; De Boeck et Amaral 2016; Elborn 2016).

1.5.3. Le contrôle de l'inflammation

Dans la mucoviscidose, la mutation du gène *CFTR* induit une diminution du pH du mucus et le recrutement de neutrophiles au niveau pulmonaire. Ces cellules augmentent la viscosité, et diminuent le taux de glutathion. Lors de la dégradation des pathogènes, les neutrophiles vont libérer des protéases et notamment des élastases, ainsi que des ROS. Le stress oxydatif qui en résulte, n'est plus neutralisé par le glutathion présent en quantité réduite, ni par la voie des Nrf2 connue pour moduler la réponse inflammatoire, mais qui est défectueuse chez les patients atteints de mucoviscidose. Pour diminuer l'inflammation, des anti-inflammatoires à large spectre sont en développement, ainsi que des antimicrobiens à activité anti-inflammatoire, des modulateurs des signaux intracellulaires, des antioxydants et des anti-protéases (Amaral 2015; Cantin *et al.* 2015; Durupt *et al.* 2016; De Boeck et Amaral 2016; Elborn 2016).

1.5.4. La correction du gène *CFTR* et/ou des effets associés aux mutations

Plusieurs approches sont envisagées pour corriger le gène *CFTR* et/ou les effets associés à sa mutation comme la correction de la protéine mutée, la correction du transcrit muté ou encore la correction du gène *CFTR* muté lui-même.

a) La correction de la protéine CFTR mutée

La correction de la protéine mutée doit permettre l'ouverture du canal chlore ; pour cela des potentialisateurs comme l'ivacaftor ont été développés. L'ivacaftor n'est cependant efficace que chez les

patients atteints de la mutation Gly551Asp ou de 8 autres mutations de classe II, rencontrées chez près de 5% seulement des patients atteints de mucoviscidose. L'ivacaftor améliore le volume expiratoire maximal par seconde, la prise de poids et diminue les symptômes respiratoires ainsi que la concentration en ions chlorure de la sueur.

A côté des potentialisateurs dont l'ivacaftor est la tête de file, différents composés ont démontré une certaine efficacité pour corriger les protéines mutées et les adresser à la membrane, notamment le curcumin, le buphényl, le génistéine, le PS-341, le miglustat SAHA. Cependant, ces molécules n'ont pas démontré d'intérêt en clinique (Sohma *et al.* 2013 ; Tildy et Rogers 2015). Des correcteurs pharmacologiques ont démontré aussi une bonne efficacité comme le VRT-325, VRT-532, GRR-4a ou le luvacaftor. Ce dernier entraine une diminution du taux de chlorures dans la sueur, mais sans amélioration clinique. Une des autres techniques visant à corriger les protéines mutées consiste à engendrer une translecture des codons prématurés avec l'utilisation d'antibiotiques de la famille des aminosides tels que la généticine, la gentamicine, la tobramycine, ou encore l'amikacine qui sont capables d'incorporer des aminoacyl-ARNt. Cependant cette dernière stratégie pose des problèmes de toxicité (Amaral 2015; Durupt *et al.* 2016; De Boeck et Amaral 2016).

b) La correction des transcrits du gène *CFTR* muté

Une autre méthode consiste à corriger le transcrit du gène *CFTR* muté, en réintroduisant le triplet nucléotidique codant la phénylalanine en position 508 avec l'utilisation d'oligonucléotides. Ces oligonucléotides modifiés chimiquement peuvent aussi être utilisés pour corriger l'épissage. En se fixant sur le transcrit, ils vont générer un encombrement stérique empêchant la reconnaissance de celui-ci par le spliceosome (Amaral 2015; Durupt *et al.* 2016; De Boeck et Amaral 2016).

c) La correction du gène *CFTR* muté

L'avènement des techniques de biologie moléculaire, avec le développement de la thérapie génique consistant à introduire de l'ADN sauvage en présence d'un promoteur exogène, permet un espoir pour le traitement de la mucoviscidose. Cependant les essais réalisés dans le cadre de la mucoviscidose ne se sont pas montrés concluants. Alton *et al*., en 2015, ont démontré une amélioration de la fonction respiratoire chez les patients traités par des lipides cationiques (Alton *et al.* 2015). D'autres approches sont à l'étude, basées sur l'utilisation de correcteurs comme les TALEN (Transactivator like Effector Nucléase), les ZFN (Zinc Finger Nucléase) ou encore le système CRISPR/Cas9 utilisé pour corriger la délétion de la phénylalanine en position 508.

Les différentes thérapies correctrices à l'étude aujourd'hui sont résumées dans la revue de Amaral (Amaral 2015; De Boeck et Amaral 2016) et de Paranjape et Mogayzel (Paranjape et Mogayzel 2017) **(Figure 9).**

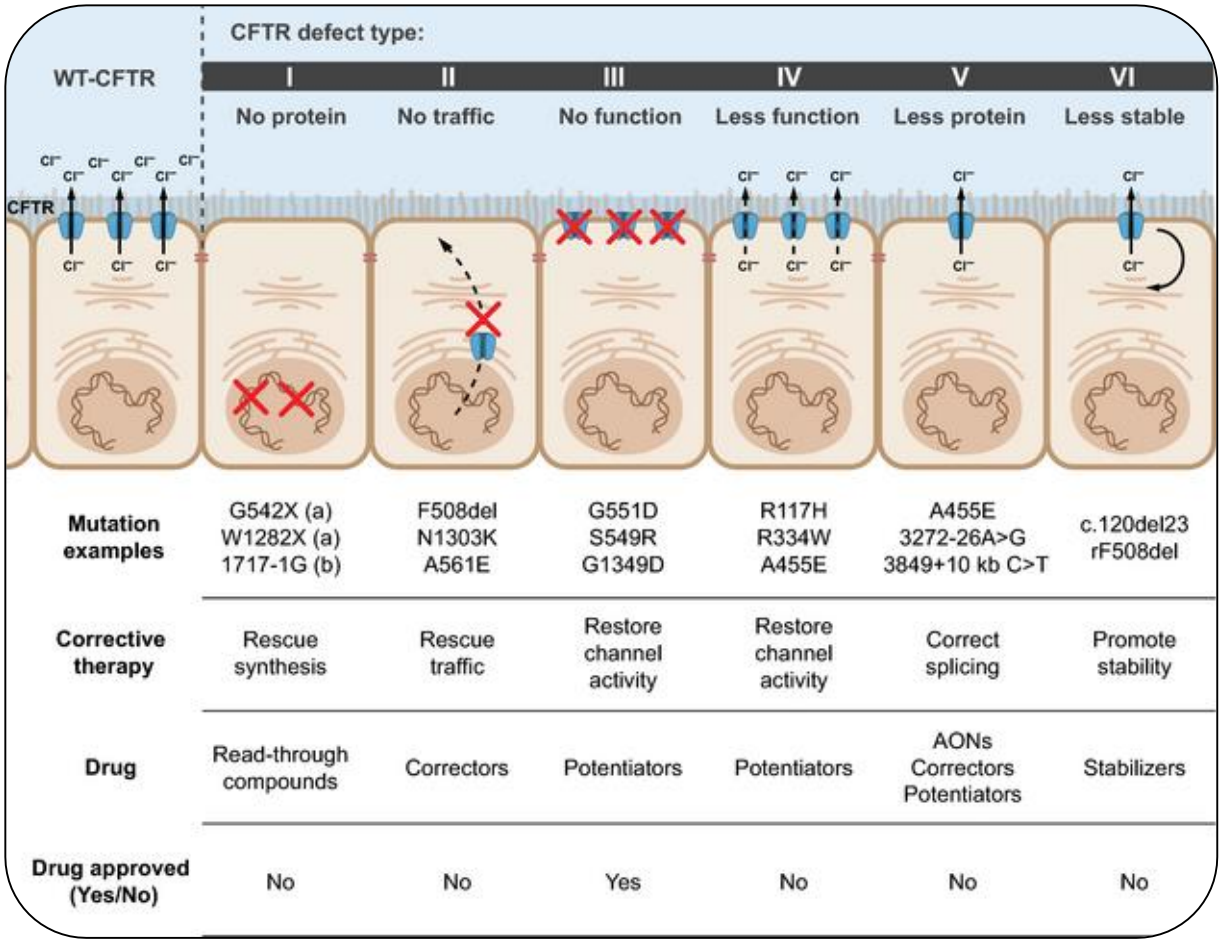


Figure 9: Thérapies développées pour le traitement de la mucoviscidose, d'après Amaral (2015)

1.6. La colonisation des voies respiratoires et les infections respiratoires au cours de la mucoviscidose

En raison de l'épaississement du mucus bronchique limitant la clairance mucociliaire, les patients atteints de mucoviscidose sont sujets à des infections respiratoires. Les microorganismes inhalés se retrouvent piégés dans le mucus bronchique devenu très visqueux et ne sont pas éliminés en raison de l'altération de la clairance muco-ciliaire. De plus, les conditions retrouvées au niveau des voies aériennes constituent un environnement favorable au développement des microorganismes.

Ces microorganismes peuvent être à l'origine d'une colonisation des voies respiratoires qui peut devenir chronique, ils peuvent aussi déterminer des infections respiratoires qui participent à la détérioration de la fonction pulmonaire (LiPuma 2010).

1.6.1. Colonisation et infections bactériennes

Deux germes sont principalement isolés des expectorations de patients atteints de mucoviscidose, sans discrimination d'âge : *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. Le registre français de la mucoviscidose de 2016 indique une fréquence de 61,7% et 40% respectivement pour ces deux

microorganismes (Bellis *et al.* 2016). Alors que la fréquence des isolements de *S. aureus* se stabilise depuis quelques années, celle de *P. aeruginosa* tend à diminuer légèrement.

Très tôt dans l'enfance, l'appareil respiratoire des patients atteints de mucoviscidose est colonisé par de multiples bactéries dont la nature et la fréquence évoluent avec l'âge. Les premiers agents bactériens isolés des expectorations sont *Haemophilus influenzae* et *S. aureus* (avec des isolats sensibles à la méthicilline initialement), retrouvés respectivement chez 38% et 58% des enfants de 0 à 4 ans (Bellis *et al.* 2016). Les données 2015 du registre français de la mucoviscidose montrent une fréquence d'isolement de *H. influenzae* de 38% de 0 à 4 ans, qui diminue de manière continue à partir de 10 à 14 ans. Inversement, la fréquence de *S. aureus* augmente au cours des 15 premières années de la vie, pour atteindre 78% entre 10 et 14 ans. La fréquence d'isolement tend ensuite à diminuer de manière continuelle jusqu'à atteindre une fréquence de 37% après l'âge de 40 ans. Il est à noter qu'inversement, la fréquence d'isolement des *Staphylococcus* résistants à la méthicilline (SARM) est relativement faible au début de la vie, puis augmente pour atteindre une valeur de 15% entre 15 et 19 ans. Au contraire des souches sensibles à la méthicilline, leur fréquence reste basse et constante au long de la vie avec une valeur moyenne de 7,8% (Bellis *et al.* 2016). La fréquence des SARM tend à diminuer depuis quelques années puisqu'elle était de 9,2% en 1999, et même de 13,5% en 2005 (Bellis *et al.* 2007, 2016).

D'autres pathogènes opportunistes sont isolés des expectorations des patients atteints de mucoviscidose comme *Achromobacter xylosoxidans*, *Burkholderia cepacia,* des mycobactéries atypiques (notamment les espèces du complexe *Mycobacterium abscessus*), *Stenotrophomonas maltophilia* et *Streptococcus* spp., avec respectivement des fréquences moyennes de 6,2%, 1,8%, 2,2%, 10,3% et 3,5%. Ces données varient peu avec l'âge, excepté pour *S. maltophilia* dont la fréquence augmente jusqu'à 15% dans la tranche d'âge 15 à 19 ans. La fréquence d'isolement de *P. aeruginosa* augmente au cours de l'enfance et de l'adolescence jusqu'à atteindre un maximum de 74% entre 30 et 34 ans. *Pseudomonas aeruginosa* est retrouvé chez 39% des patients, et la colonisation est chronique pour 21% des patients ; enfin, 6,3% des patients sont colonisés par des souches de *P. aeruginosa* multi-résistants (Bellis *et al.* 2016). Les données du registre français de la mucoviscidose de 1999 et 2005 font état d'une fréquence d'isolement de 49% et 47% respectivement **(Figure 10)** (Bellis *et al.* 2007). L'isolement de *P. aeruginosa* dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose tend à diminuer légèrement.

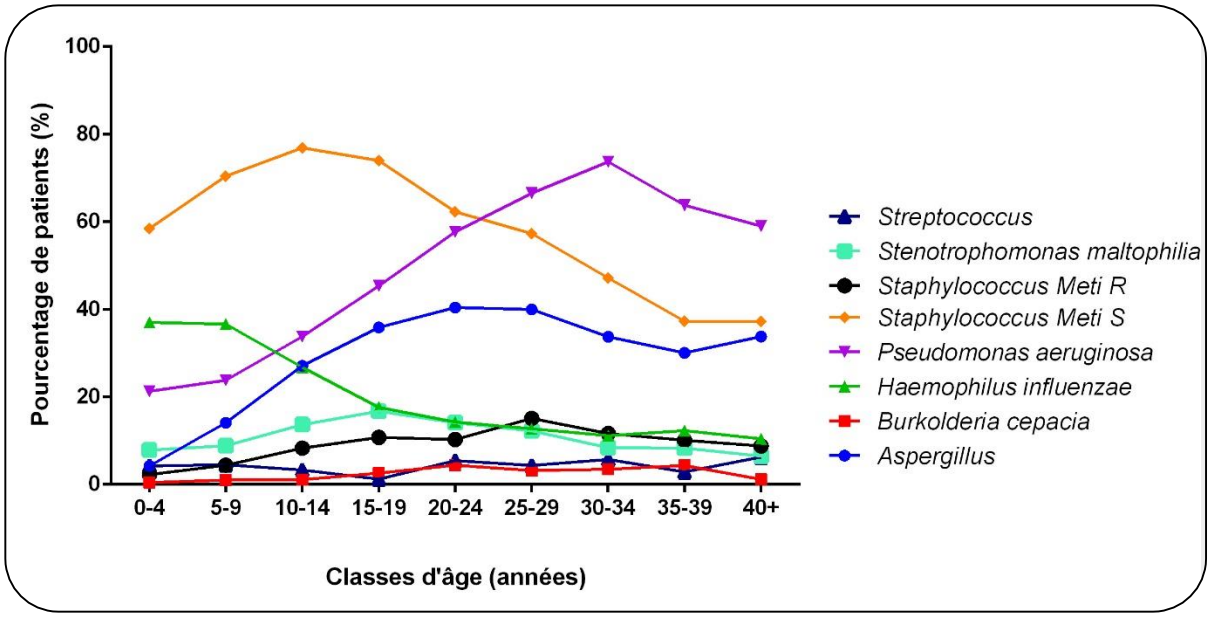


Figure 10: Fréquence d'isolement des bactéries et des *Aspergillus* à partir des expectorations de patients atteints de mucoviscidose en fonction de l'âge, d'après Bellis *et al.* (2016).

1.6.2. Colonisation et infections fongiques

Les colonisations et infections fongiques sont d'apparition plus tardive dans l'évolution de la maladie, les bactéries favoriseraient l'installation des champignons en générant des lésions cellulaires épithéliales et en sensibilisant les voies respiratoires des patients (LiPuma 2010). Les infections fongiques sont en effet rares chez les jeunes enfants et deviennent plus fréquentes à l'adolescence (Cimon *et al.* 1995; Mortensen *et al.* 2011a,b). Elles sont par ailleurs souvent associées à des infections bactériennes ou virales, à l'origine de multi-infections.

De nombreuses espèces de levures et de champignons filamenteux sont isolées des expectorations des patients atteints de mucoviscidose, certaines entraînent une simple colonisation des voies aériennes tandis que d'autres espèces peuvent être à l'origine de véritables infections respiratoires. Différents types de colonisation sont observés : les colonisations transitoires (qu'il est préférable de qualifier de portage transitoire), et les colonisations chroniques avec un génotype dominant conservé pendant plusieurs mois ou années, ou plus rarement avec plusieurs génotypes simultanément.

Actuellement, il n'existe pas de méthodes standardisées de détection et d'identification des espèces fongiques dans les prélèvements. Cette absence de standardisation induit de fortes variations d'une étude à l'autre dans le panel des espèces isolées et leur fréquence ; une standardisation de l'examen mycologique est nécessaire pour mieux appréhender l'épidémiologie de ces infections, et faciliter les comparaisons entre les études.

a) Les levures

Les levures du genre *Candida* sont particulièrement fréquentes dans les expectorations des patients atteints de mucoviscidose. *Candida albicans* en particulier est retrouvé, selon les études, chez 38% à 93% des patients (Haase *et al.* 1991; Doern et Brogden-Torres 1992; Cimon *et al.* 2000a; Bakare *et al.* 2003; Muthig *et al.* 2010; Kramer *et al.* 2015; Garczewska *et al.* 2016; Ziesing *et al.* 2016). Les autres espèces du genre *Candida* sont moins fréquentes : *Candida dubliniensis* (11% à 23,6%), *Candida parapsilosis* (3 à 13,8%), *Candida glabrata* (4,3 à 12,5%), *Candida tropicalis* (1 à 6%), et plus rarement d'autres espèces retrouvées avec une fréquence inférieure à 1% (Doern et Brogden-Torres 1992; Muthig *et al.* 2010; Kramer *et al.* 2015; Garczewska *et al.* 2016; Ziesing *et al.* 2016). Bien que ces levures puissent être responsables de colonisation chronique des voies respiratoires, voire d'infections respiratoires, leur isolement à partir des expectorations peut aussi résulter d'une contamination des prélèvements par des levures de la cavité buccale. Par ailleurs, le rôle de ces levures dans la dégradation clinique et fonctionnelle est très discuté.

D'autres levures ont été signalées dans la mucoviscidose de manière plus rare. Certaines de ces levures, parfois à l'origine d'une colonisation chronique, peuvent aussi engendrer des infections sévères. C'est notamment le cas de *Trichosporon mycotoxinivorans*, qui a été décrit pour la première fois en 2004 (Molnar *et al.* 2004), puis signalé dans la mucoviscidose à partir de 2009 (Hickey *et al.* 2009; Hirschi *et al.* 2012; Kröner *et al.* 2013; Shah *et al.* 2014; Martínez Muñiz *et al.* 2016; Esther *et al.* 2016; Goldenberger *et al.* 2016; Hong *et al.* 2017a). Cette levure présente une résistance intrinsèque aux échinocandines, et est peu sensible à l'amphotéricine B et aux triazolés (Chagas-Neto *et al.* 2008, 2009; Hickey *et al.* 2009).

Enfin, des levures du genre *Malassezia* pourraient aussi coloniser les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose : de l'ADN de certaines espèces de *Malassezia* lipophiles a été détecté dans les expectorations de certains patients, mais ces levures n'ont jamais été isolées par mise en culture des sécrétions respiratoires (Kanj *et al.* 1997; Nagano *et al.* 2010; Delhaes *et al.* 2012; Willger *et al.* 2014).

b) Les champignons filamenteux

- ***Les espèces du genre Aspergillus***

Les espèces du genre *Aspergillus* sont les principaux pathogènes fongiques associés à la mucoviscidose. La fréquence d'isolement de ces champignons dans la mucoviscidose est très variable d'une étude à l'autre. Le représentant le plus fréquent est *Aspergillus fumigatus*, dont la prévalence varie de 2,7% à 60% (Cimon *et al.* 2000a; Paugam *et al.* 2010; Parize *et al.* 2014; Burgel *et al.* 2015; Kramer *et al.* 2015; Burgel 2016; Ziesing *et al.* 2016). En France, les données du registre français de la mucoviscidose montrent une augmentation de sa fréquence à partir de l'adolescence (Bellis *et al.* 2016).

D'autres espèces d'*Aspergillus* sont aussi associées à la mucoviscidose comme *Aspergillus terreus*, dont la fréquence varie entre 1,9% et 6,2% (Cimon *et al.* 1995, 2000a; Ziesing *et al.* 2016). Les études de Paugam *et al*. (2010) et de Ziesing *et al*. (2016) ont montré la présence de certaines espèces, comme *Aspergillus flavus* (0,7%-3,4%), *Aspergillus niger* (2,9%-4,7%) et *Aspergillus nidulans* (1%-9%). Enfin

Aspergillus lentulus et *Neosartorya pseudofischeri* ont été retrouvées dans les expectorations des patients à des fréquences inférieures à 1% (Symoens *et al.* 2010; Ziesing *et al.* 2016).

Les études moléculaires menées sur *A. fumigatus* ou *A. terreus* ont mis en évidence différents profils de colonisation, avec des portages transitoires, et des colonisations chroniques dues à un génotype prédominant ou à plusieurs génotypes rencontrés de manière successive ou simultanée (Vanhee *et al.* 2008b,a; de Valk *et al.* 2009; Rougeron *et al.* 2014). Le suivi des patients suggèrent que certains génotypes seraient sélectionnés avec l'évolution de la colonisation (Cimon *et al.* 2001).

Les espèces du genre *Aspergillus* sont responsables de colonisation des voies aériennes, mais de véritables infections respiratoires peuvent aussi survenir. *Aspergillus fumigatus* est connu pour engendrer de l'asthme, des bronchites, des aspergillomes, mais la forme clinique la plus classique au cours de la mucoviscidose est l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique ou ABPA (Pihet *et al.* 2008; King *et al.* 2016). L'étude de Burgel *et al.* (2016) indique qu'environ 10% des patients atteints de mucoviscidose développe une ABPA, d'autres études font état d'une prévalence variant de 0,9% à 15% (Schønheyder *et al.* 1988; de Vrankrijker *et al.* 2011; King *et al.* 2016; Janahi *et al.* 2017).

Depuis quelques années, il a été démontré chez les espèces du genre *Aspergillus* l'émergence de phénomènes de résistance aux azolés, à l'origine de difficultés accrues dans la prise en charge thérapeutique (Howard *et al.* 2006, 2009, 2011; Bueid *et al.* 2010; Mortensen *et al.* 2011b; Burgel *et al.* 2012, 2016; Morio *et al.* 2012; Fischer *et al.* 2014; Lavergne *et al.* 2015; Prigitano *et al.* 2017; Hamprecht *et al.* 2017). Ces résistances peuvent survenir à la suite de traitements prolongés par itraconazole ou voriconazole, mais des résistances aux azolés sont de plus en plus fréquemment décrites chez des patients naïfs (n'ayant jamais reçu d'antifongiques azolés auparavant), qui seraient liées à l'utilisation de fongicides azolés dans l'agriculture.

- ***Les espèces du genre Scedosporium***

Les espèces de genre *Scedosporium* ont pour la première fois été décrites dans le contexte de la mucoviscidose en 1991. Chabasse *et al*. (1991) ont décrit l'isolement de *Scedosporium apiospermum* dans les expectorations de trois patients atteints de mucoviscidose après administration d'itraconazole pour traitement d'infections respiratoires à *A. fumigatus.* La prévalence des espèces du genre *Scedosporium* dans la mucoviscidose est très variable d'une étude à l'autre. Ces variations peuvent traduire des différences dans la distribution de ces champignons d'un pays à l'autre, mais aussi d'une région à l'autre (Borman *et al.* 2010; Sedlacek *et al.* 2015), mais elles sont plus vraisemblablement dues à un manque de standardisation des méthodes de détection (Borman *et al.* 2010).

Les différentes données font état d'une prévalence comprise entre 0,3% et 17,4% (Cimon *et al.* 1995, 2000b; Williamson *et al.* 2001; Horré et Marklein 2009; Heath *et al.* 2009; Blyth *et al.* 2010b; Paugam *et al.* 2010; Manso *et al.* 2011; Zouhair *et al.* 2013; Parize *et al.* 2014; Sedlacek *et al.* 2015; Kramer *et al.* 2015; Garczewska *et al.* 2016; Ziesing *et al.* 2016; Schwarz *et al.* 2017a). Cet intervalle prend en compte les résultats de l'étude de Garczewska *et al*. (2016), menée en Pologne, où les espèces du genre *Scedosporium* ont été isolées sur milieu non spécifique. Il a été précédemment démontré que l'utilisation de milieux sélectifs facilitait la détection des *Scedosporium* (Horré et Marklein 2009; Borman

et al. 2010). En effet, les *Scedosporium* sont souvent associés à des *Aspergillus*, notamment *A. fumigatus* qui a une croissance rapide et extensive sur gélose non sélective, alors que les *Scedosporium* ont une croissance lente et seraient masqués par l'*Aspergillus*. Ainsi, une étude Australienne, utilisant un milieu sélectif (Sce-Sel+), rapporte une fréquence de 17,4% (Blyth *et al.* 2010b). Les patients atteints de mucoviscidose sont colonisés par ces champignons au cours de l'adolescence, et cette colonisation fait généralement suite à la colonisation des voies respiratoires par *A. fumigatus* (Cimon *et al.* 2000b). Les études menées en France ont montré une fréquence de 8,6% (Cimon *et al.* 2000b). Des différences géographiques dans la fréquence de ces champignons ont été signalées par Borman *et al.* (2010), avec une fréquence de 0,3% et 8,8% en 2006 à Rouen et Angers respectivement, alors qu'aucun isolement de ces champignons n'était rapporté la même année à Lille. Les données collectées à Angers montrent une augmentation de la fréquence d'isolement avec l'utilisation de milieux sélectifs, passant de 2,17% en 1992 à 8,8% en 2006. Les données de 2008 obtenus dans les hôpitaux de Giens (2,2%), Rennes (0,4%) et Marseille (0,9%) montre une variation de la répartition de *Scedosporium* dans les expectorations des patients. Deux études de Paugam *et al.* et Parize *et al.* font état d'une fréquence d'isolement de 3,4% et 2,1% respectivement (Paugam *et al.* 2010; Parize *et al.* 2014).

Comme les *Aspergillus*, les *Scedosporium* peuvent engendrer différents profils de colonisation, mais il s'agit principalement d'une colonisation chronique par un génotype unique, différent d'un patient à l'autre et conservé tout au long du suivi (Zouhair *et al.* 2001; Defontaine *et al.* 2002). En France, les principales espèces associées à la mucoviscidose sont *S. boydii* et *S. apiospermum,* qui représentent respectivement 62% et 24% des isolats de *Scedosporium* (Zouhair *et al.* 2013). Les études menées dans d'autres pays montrent une répartition différente, avec une prédominance de *S. aurantiacum* en Australie (Blyth *et al.* 2010a,b) et de *S. apiospermum* (49%) et *S. boydii* (29%) en Allemagne (Sedlacek *et al.* 2015; Ziesing *et al.* 2016). Ces derniers résultats sont cependant contredits par l'étude multicentrique menée en Allemagne par Schwarz *et al.* (2017a) montrant une répartition un peu différente, avec une fréquence comparable pour *S. boydii* et *S. apiospermum.*

La colonisation des voies respiratoires par les *Scedosporium* est généralement asymptomatique. Néanmoins, elle contribuerait à la réaction inflammatoire par la sécrétion par le champignon de diverses enzymes, notamment de protéases, et le relargage de métabolites pouvant affecter la fonction pulmonaire (Pihet *et al.* 2008). Par ailleurs, les *Scedosporium* peuvent aussi déterminer des mycoses broncho-pulmonaires allergiques comparables à l'ABPA (Cimon *et al.* 2000a) et engendrer des infections disséminées lors d'une transplantation pulmonaire ou cœur-poumons chez des patients colonisés avant transplantation (Symoens *et al.* 2006; Sahi *et al.* 2007; Borghi *et al.* 2010; Hirschi *et al.* 2012; Campa-Thompson *et al.* 2014; Thomson *et al.* 2015; Gonzalez-Garcia *et al.* 2017; Parize *et al.* 2017). En raison de leur faible sensibilité aux antifongiques, la colonisation des voies respiratoires par ces champignons constituerait pour certains cliniciens une contre-indication à la transplantation. Cependant une étude récente au cours de laquelle un suivi a été effectué durant 15 ans après transplantation pulmonaire chez des patients atteints de mucoviscidose n'a pas permis d'établir de lien entre une colonisation pulmonaire pré-transplantation et une augmentation de la mortalité et de la morbidité (Parize *et al.* 2017).

- ***Les espèces du complexe Rasamsonia argillacea***

Autrefois connu sous le nom de *Geosmithia argillacea* et initialement décrit comme une espèce de *Penicillium* (*P. emersonii*), *Rasamsonia argillacea* est aujourd'hui considéré comme un complexe de quatre espèces distinctes, dont trois sont capables de coloniser les voies respiratoires de patients atteints de mucoviscidose, *R. argillacea sensu stricto*, *R. aegroticola* et *R. piperina* (Cimon *et al.* 1999; Giraud *et al.* 2010, 2013; Houbraken *et al.* 2013). Ces pathogènes émergents ont été pour la première fois décrits dans la mucoviscidose en 1999 ; depuis le nombre de cas de colonisation/infection par ces champignons n'a cessé d'augmenter dans le contexte de la mucoviscidose (Cimon *et al.* 1999; Giraud *et al.* 2010, 2013; Barton *et al.* 2010; Marguet *et al.* 2012; Labbé *et al.* 2013; Masoud-Landgraf *et al.* 2014; Matos *et al.* 2015; Mouhajir *et al.* 2016; Hong *et al.* 2017b,a) ou de la granulomateuse chronique familiale (De Ravin *et al.* 2011; Machouart *et al.* 2011). Une étude récente réalisée en Allemagne montrait une fréquence d'isolement de 0,15% dans la mucoviscidose (Ziesing *et al.* 2016). Ces champignons présentent une morphologie proche des *Penicillium* et *Paecilomyces* avec lesquels ils peuvent être confondus, et leur fréquence pourrait donc être sous-estimée. Les espèces les plus fréquemment retrouvées chez l'homme sont *R. argillacea sensu stricto,* puis *R. aegroticola* (Giraud *et al.* 2013). Ces champignons présentent une résistance intrinsèque au voriconazole, et une sensibilité variable à l'amphotéricine B et au posaconazole, mais sont sensibles aux échinocandines (Houbraken *et al.* 2013; Hong *et al.* 2017b). Ces résistances pourraient se révéler problématiques en cas de transplantation. Très récemment, un cas d'infection disséminée fatale a été décrit après transplantation pulmonaire (Hong *et al.* 2017b).

- ***Lomentospora prolificans***

Jusqu'à peu, *Lomentospora prolificans* était classé parmi les *Scedosporium* (anciennement *Scedosporium prolificans,* puis *Scedosporium inflatum*), mais les analyses phylogénétiques ont montré qu'il était très éloigné des *Scedosporium* (Lackner *et al.* 2014b). Ce champignon est responsable d'infections très diverses. L'analyse des cas décrits dans la littérature montre que l'isolement de *L. prolificans* est associé dans 11,7% des cas à la mucoviscidose (Rodriguez-Tudela *et al.* 2009). Ce champignon est principalement rencontré en Australie, Espagne et aux Etats-Unis (Berenguer *et al.* 1997; Idigoras *et al.* 2001; Cooley *et al.* 2007; Delhaes *et al.* 2008; Blyth *et al.* 2010b; Lackner *et al.* 2011b), alors que sa fréquence reste faible en France, en Angleterre, en Allemagne ou aux Pays-bas (Rabodonirina *et al.* 1994; Hopwood *et al.* 1995; Nenoff *et al.* 1996; Tintelnot *et al.* 2009). Une fréquence de 5,8% a été estimée en Australie (Blyth *et al.* 2010b), alors qu'elle n'est que de 0,3% à 0,7% en Allemagne (Sedlacek *et al.* 2015; Ziesing *et al.* 2016; Schwarz *et al.* 2017a) et de 0,5% en France (Parize *et al.* 2014).

Ce pathogène est résistant à l'amphotéricine B et peu sensible aux azolés (Husain *et al.* 2005; Rodriguez-Tudela *et al.* 2009; Lackner *et al.* 2011b) ; cette multi-résistance explique la sévérité des infections disséminées à *L. prolificans* chez les patients atteints de mucoviscidose après transplantation, imposant le recours à des associations d'antifongiques, voriconazole + terbinafine par exemple (Vagefi *et al.* 2005).

- ***Exophiala dermatitidis***

Exophiala dermatitidis, anciennement connu sous le nom de *Wangiella dermatitidis,* appartient au groupe des levures noires. Il s'agit en effet d'un champignon dimorphique, présentant une forme levure à 37°C et une forme filamenteuse à 20-25°C. Ce champignon est capable de coloniser les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose et d'engendrer des infections pulmonaires (Haase *et al.* 1990; Kusenbach *et al.* 1992; Diemert *et al.* 2001; Horré *et al.* 2004; Griffard *et al.* 2010; Kondori *et al.* 2011; Packeu *et al.* 2012; Babič *et al.* 2017). Il est retrouvé dans les glaciers, les zones polluées par l'homme et les zones humides comme les hammams, salles de bain, cuisines et lave-vaisselles (Zalar *et al.* 2011; Babič *et al.* 2017). La contamination de l'homme se ferait par inhalation d'aérosols chargés de levures (Babič *et al.* 2017). Les études ont montré une grande variabilité dans la fréquence d'isolement de ce champignon, avec une prévalence variant entre 1,8% et 15,7% en Allemagne dans le cadre de la mucoviscidose (Haase *et al.* 1991; Horré *et al.* 2004; Kramer *et al.* 2015; Ziesing *et al.* 2016). Des fréquences très variables ont été rapportées dans d'autres pays : 4,7% aux USA (Hong *et al.* 2017a), 4,5% en Belgique (Lebecque *et al.* 2010), 8,8% en Autriche (Masoud-Landgraf *et al.* 2014) et 19% en Suède (Kondori *et al.* 2011). En France, elle est très faible : 0,4% à Giens, et 2,2% à Rennes (Borman *et al.* 2010). Afin d'isoler plus facilement ces levures, un milieu sélectif à base d'érythritol a été proposé (Horré *et al.* 2011). Malgré l'utilisation de ce milieu de culture, la fréquence de ce champignon reste très faible en France (Coron *et al*. 2017).

- ***Acrophialophora fusispora***

Acrophialophora fusispora est un champignon tellurique très rare en mycologie médicale, mais peut être aussi méconnu. Dans le contexte de la mucoviscidose, un portage transitoire peut survenir, mais ce champignon peut également déterminer une colonisation chronique (González-Escalada *et al.* 2000; Cimon *et al.* 2005). Comme pour *R. argillacea*, il est possible que sa prévalence dans la mucoviscidose soit sous-estimée en raison de confusions possibles pouvant exister avec d'autres champignons filamenteux comme *L. prolificans, Scopulariopsis chartarum,* ou encore des *Paecilomyces* (Pihet *et al.* 2008).

- ***Pneumocystis jirovecii***

Pneumocystis jirovecii est un champignon opportuniste atypique, initialement considéré comme un protozoaire, et reclassé parmi les champignons récemment. Anciennement connu sous le nom de *Pneumocystis carinii f sp hominis*, ce champignon présente une distribution mondiale. Sa prévalence est cependant très variable d'un pays à l'autre. Ce pathogène à tropisme pulmonaire n'est pas cultivable, et son identification se fait par l'examen direct d'un lavage broncho-alvéolaire ou par PCR. Les études menées en Espagne, au Brésil et en Allemagne montre des fréquences respectives de 21,6% (Respaldiza *et al.* 2005), 38,2% (Pederiva *et al.* 2012), 7,4% (Sing *et al.* 2001) dans la mucoviscidose. En France, sa fréquence dans ce contexte clinique est beaucoup plus faible, de 1,3% à Brest et de 3,5% à Rennes, avec une valeur moyenne de 2,5% en Bretagne (Le Gal *et al.* 2010; Nevez *et al.* 2017). Une étude multicentrique menée par Hernandez-Hernandez *et al.* (2012) a montré une fréquence moyenne en France beaucoup plus élevée, de 12,5%, avec cependant des différences géographiques importantes entre les centres de 5% à Lille à 20%, 22% et 25% à Dunkerque, Angers et Bordeaux. Ces différences pourraient être liées à des

variations climatiques, la fréquence de ce champignon étant d'autant plus faible que le climat est plus froid (Hernández-Hernández *et al.* 2012). Au cours de ces études, il a été démontré l'existence de trois génotypes chez les patients atteints de mucoviscidose, avec la présence d'un génotype majoritaire appelé génotype 1 souvent associé au génotype 3 (Respaldiza *et al.* 2005; Montes-Cano *et al.* 2007; Calderón *et al.* 2010; Pederiva *et al.* 2012; Hernández-Hernández *et al.* 2012). Deux études ont rapporté l'existence chez les patients atteints de mucoviscidose d'un cycle de colonisation/clairance continu de *P. jirovecii*. Ce champignon est responsable de pneumonie chez les individus immunodéprimés ; chez les patients atteints de mucoviscidose il n'engendrerait pas de pneumonie, mais les patients colonisés seraient un réservoir de ce pathogène et permettraient sa transmission (Calderón *et al.* 2010). L'étude de Green *et al*. (2016) a montré une augmentation de la fréquence de *P. jirovecii* chez les patients souffrant d'exacerbations pulmonaires (9,2%) par rapport aux patients dit stables (2%) (Green *et al.* 2016). Un cas d'infection chez un enfant atteint de mucoviscidose a été décrit (Kaur *et al.* 2016). En outre, des infections léthales ont été décrites après transplantation pulmonaire. Parmi 55 transplantés pulmonaires étudiés en Italie, 6 patients étaient colonisés par ce pathogène avant transplantation, et deux d'entre eux ont développé une infection léthale à *P. jirovecii* après transplantation (Quattrucci *et al.* 2005). En raison de l'augmentation de sa fréquence et de sa résistance aux molécules actuellement disponibles, la recherche de ce champignon avant transplantation semble nécessaire afin de limiter le risque d'infection post-transplantation.

Un grand nombre d'autres espèces fongiques sont retrouvées dans les expectorations de patients atteints de mucoviscidose comme *Arthrographis, Cladosporium, Fusarium, Paecilomyces, Penicillium* (Pihet *et al.* 2008; Delhaes *et al.* 2012; Sedlacek *et al.* 2015; Kramer *et al.* 2015; Garczewska *et al.* 2016; Ziesing *et al.* 2016). Certains sont des contaminants de l'environnement extérieur, tandis que d'autres pourraient être à l'origine de colonisations et infections, et pourraient voir leur fréquence augmenter à l'avenir.

1.6.3. Colonisation et infections virales

En plus des bactéries, levures et champignons filamenteux, les patients atteints de mucoviscidose peuvent développer des infections respiratoires d'origine virale. Ces infections sont le plus souvent rencontrées dans l'enfance, comme le virus syncytial et le virus influenzae. La fréquence de ces infections est proche de celle observée en dehors de la mucoviscidose, néanmoins elles contribuent à la détérioration de la fonction respiratoire. De plus, certaines études émettent l'hypothèse qu'elles favoriseraient l'installation des bactéries en facilitant leur accès à la membrane basale (LiPuma 2010).

2. Les espèces du genre *Scedosporium*

Les espèces du genre *Scedosporium* sont des champignons filamenteux appartenant à l'embranchement des Ascomycètes, à la classe des Sordariomycètes et à l'ordre des Microascales.

2.1. Morphologie de ces champignons

2.1.1. Morphologie macroscopique

Les *Scedosporium* sont des champignons filamenteux à croissance lente, les colonies atteignent la maturité en 7 à 10 jours sur milieu YPDA (Yeast extract-Peptone-Dextrose-Agar) ou PDA (Potatoes-Dextrose-Agar). Les *Scedosporium* sont capables de croître à des températures allant de 25°C à 42°C, cependant leur optimum thermique est voisin de 37°C, hormis pour l'espèce *Scedosporium dehoogii* pour lequel l'optimum thermique serait de 25°C.

Les *Scedosporium* produisent des colonies cotonneuses ou laineuses, blanches au début, puis grisâtres en vieillissant en raison de la production de spores mélanisées **(Figure 11)**. Un pigment orangé peut être observé chez *Scedosporium aurantiacum.* Le verso est gris à noir (Guarro *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2008).

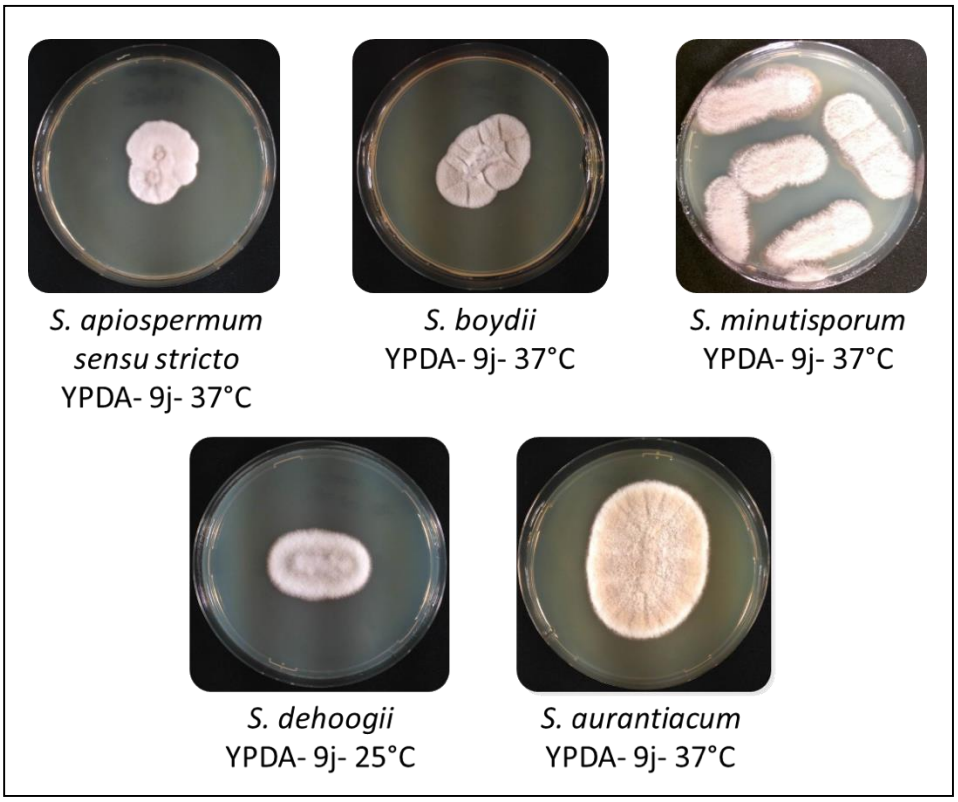


Figure 11: Macroscopie des espèces du genre *Scedosporium*

2.1.2. Morphologie microscopique

Les *Scedosporium* sont caractérisés par la présence d'hyphes fins et cloisonnés, et d'annellospores terminales. Certaines espèces de ce genre sont également capables de se reproduire selon le mode sexué. Pendant plusieurs années la taxonomie de ces espèces se basait exclusivement sur la morphologie.

Deux formes de reproduction peuvent se voir :

- La forme *Scedosporium* caractérisée par la présence de filaments végétatifs septés, hyalins et fins (d'un diamètre d'environ 2 à 3 µm), présentant des ramifications à angle droit. Cette forme produit des aleuries se formant généralement à l'extrémité de conidiophores courts et fins, parfois directement sur les côtés des filaments végétatifs. Les conidiophores sont cylindriques, et se terminent par une spore ovoïde ou claviforme, brune, à base tronquée, mesurant 5 à 6 µm de large sur 6 à 14 µm de long (Guarro *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2008)**(Figure 12)**.

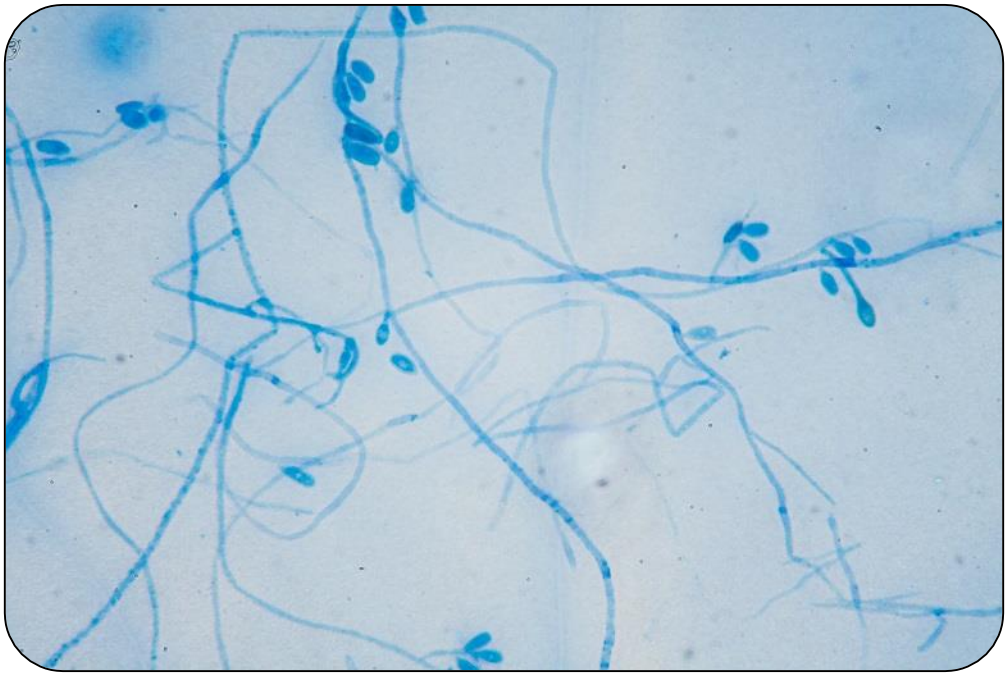


Figure 12: Morphologie microscopique de *S. apiospermum* après coloration au bleu lactique (grossissement X 400).

- La forme *Graphium* est parfois associée à la forme *Scedosporium* ; elle est caractérisée par la présence de corémies, constituées de plusieurs conidiophores disposés parallèlement les uns aux autres, terminés à leurs extrémités par des cellules conidiogènes. Les cellules conidiogènes sont des annellides produisant à leur sommet une série de spores toujours unicellulaires, lisses et hyalines, plus petites (2-3 µm x 5-7 µm) et plus allongées, cylindriques (Guarro *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2008) **(Figure 13)**.

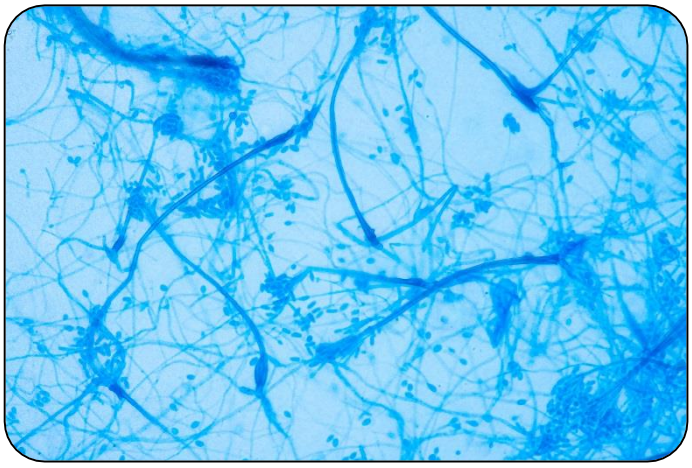


Figure 13: Corémies du stade *Graphium* sur une souche de *S. apiospermum* (coloration au bleu lactique ; grossissement X 100).

Certaines espèces présentent aussi une forme sexuée, autrefois nommée *Pseudallescheria*. Cette forme sexuée se caractérise par la présence de cléistothèces sphériques, jaune-bruns, de 140 à 180 µm de diamètre. Les cléistothèces renferment des asques à paroi fugace, contenant eux-mêmes des ascospores elliptiques, unicellulaires, de couleur jaune pâle à cuivrée, et mesurant de 4 à 5 µm de large sur 7 à 9 µm de long, qui sont libérées par déchirement de la paroi du cléistothèce à maturité (Guarro *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2008) **(Figure 14)**.

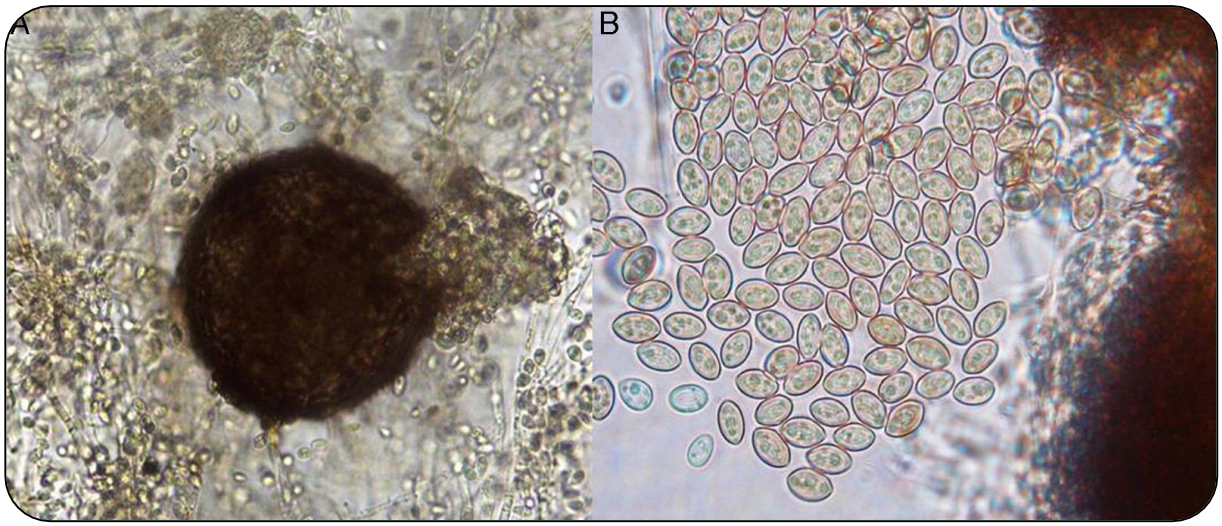


Figure 14: Cléistothèces de *S. boydii* (A), libérant des ascospores après rupture (B) (Vanzzini-Zago *et al.* 2016)

Il a été observé qu'après de nombreux repiquages, les isolats pouvaient perdre leur capacité de sporulation et donner des colonies cotonneuses et blanchâtres. Microscopiquement, il est observé un gonflement des cellules des hyphes, ainsi qu'une désarticulation des filaments pouvant faire penser à des arthroconidies (Guarro *et al.* 2006).

2.2. Taxonomie

La taxonomie des *Scedosporium* a beaucoup évolué, notamment au cours des dix dernières années.

2.2.1. Historique

En 1911, Saccardo isole d'un mycétome une souche fongique qu'il nomme *Monosporium apiospermum,* mais qui est renommée *Scedosporium apiospermum* en 1919 par Castellani et Chalmers. En 1922, Sear décrit le cycle de vie d'un champignon isolé d'un mycétome, *Allescheria boydii*. Pendant plusieurs années *A. boydii* et *S. apiospermum* ont été considérés comme deux espèces distinctes, et ce n'est qu'en 1944 qu'Emmons démontre que ces deux champignons présentaient une morphologie semblable. Depuis cette date et jusqu'en 2008 (Gilgado *et al.* 2008), *S. apiospermum* et *A. boydii* (renommé *Petriellidium boydii* en 1970 par Malloch, puis *Pseudallescheria boydii* en 1982 par McGinnis *et al*.) furent considérés comme une même espèce, se présentant sous deux aspects différents, correspondant respectivement à la forme asexuée (ou stade anamorphe) et la forme sexuée (ou téléomorphe). Cependant les travaux du groupe de Guarro ont montré qu'il s'agit en fait de deux espèces distinctes.

Une soixantaine d'isolats ont été étudiés par Gilgado *et al.* (2005, 2008). Sur la base de critères morphologiques, physiologiques (température optimale de croissance, assimilation des hydrates de carbone) et moléculaires (séquençage des régions ITS pour Internal Transcribed Spacer Regions des ADN ribosomaux, de deux portions du gène codant la β-tubuline et d'une partie du gène codant la calmoduline), cinq clades ont été mis en évidence, correspondant à des espèces distinctes :

- Clade 1 correspondant à une nouvelle espèce dénommée *S. aurantiacum,* produisant un pigment jaune-orangé, et capable de croître jusqu'à 45°C. Comparée aux autres *Scedosporium*, cette espèce produit des conidies plus étroites.
- Clade 2 correspondant lui aussi à une nouvelle espèce dénommée *P. minutispora,* capable de croître jusqu'à 40°C.
- Clade 3 correspondant également à une nouvelle espèce dénommée *S. dehoogii,* caractérisée par des colonies claires, avec des conidiophores sans ramification, et une température optimale de croissance de 25°C.
- Clade 4 qui regroupait les isolats de *S. apiospermum* (téléomorphe : *Pseudallescheria apiosperma*), caractérisés par des colonies de couleur foncée et des conidiophores ramifiés.
- Clade 5 qui regroupait les isolats de *P. boydii* (anamorphe : *S. boydii*) et plusieurs espèces apparentées : *P. angusta, P. ellipsoidea* et *P. fusoidea.*

2.2.2. Classification actuelle

A la suite de la déclaration d'Amsterdam *One fungus - One name*, il a été décidé de ne plus utiliser cette nomenclature binomiale (anamorphe – téléomorphe), et depuis 2014 (Lackner *et al.* 2014b), la dénomination *Pseudallescheria* ne peut plus être utilisée. A la même date, *Scedosporium prolificans* a été reclassé dans un autre genre ; on parle aujourd'hui de *Lomentospora prolificans*.

Dix espèces sont aujourd'hui reconnues dans le genre *Scedosporium* : *S. aurantiacum, S. cereiosporum* décrit en 2016 (Crous *et al.* 2016), *S. dehoogii, S. desertorum, S. minutisporum, S. angustum, S. apiospermum, S. boydii, S. ellipsoideum* et *S. fusoideum* (Ramirez-Garcia *et al.* 2017b) **(Figure 15)**

2.3. Ecologie

La mise en place de mesures préventives nécessite une meilleure connaissance des niches écologiques et des sources de contamination des patients.

Les espèces du genre *Scedosporium* sont des saprophytes, retrouvés notamment dans les zones polluées par les activités humaines (April *et al.* 1998; Kaltseis *et al.* 2009; Harun *et al.* 2010). Ces champignons sont retrouvés aussi bien dans les régions tempérées que dans les zones tropicales, avec cependant des différences dans la distribution des espèces d'un pays à l'autre. Actuellement l'habitat naturel de ces champignons n'a pas été identifié (Guarro *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2008). Ces champignons ont été isolés de sols pollués (April *et al.* 1998), dans du fumier de bétail et les déjections de volailles (Bell 1976; Rippon et Carmichael 1976; Rougeron *et al.* 2017), mais aussi dans les excréments de chauves-souris ou de merles (Brandsberg *et al.* 1969; Rougeron *et al.* 2017). Ces champignons ont aussi été isolés dans les eaux usées (de Hoog *et al.* 1994) ou des eaux boueuses (Fisher *et al.* 1982; Janda-Ulfig *et al.* 2008), dont l'inhalation est à l'origine des scédosporioses cérébrales suite à une pseudo-noyade (Fisher *et al.* 1982; Tintelnot *et al.* 2008; Horré *et al.* 2010). Ils ont également été isolés d'une eau de piscine publique (Aho et Hirn 1981).

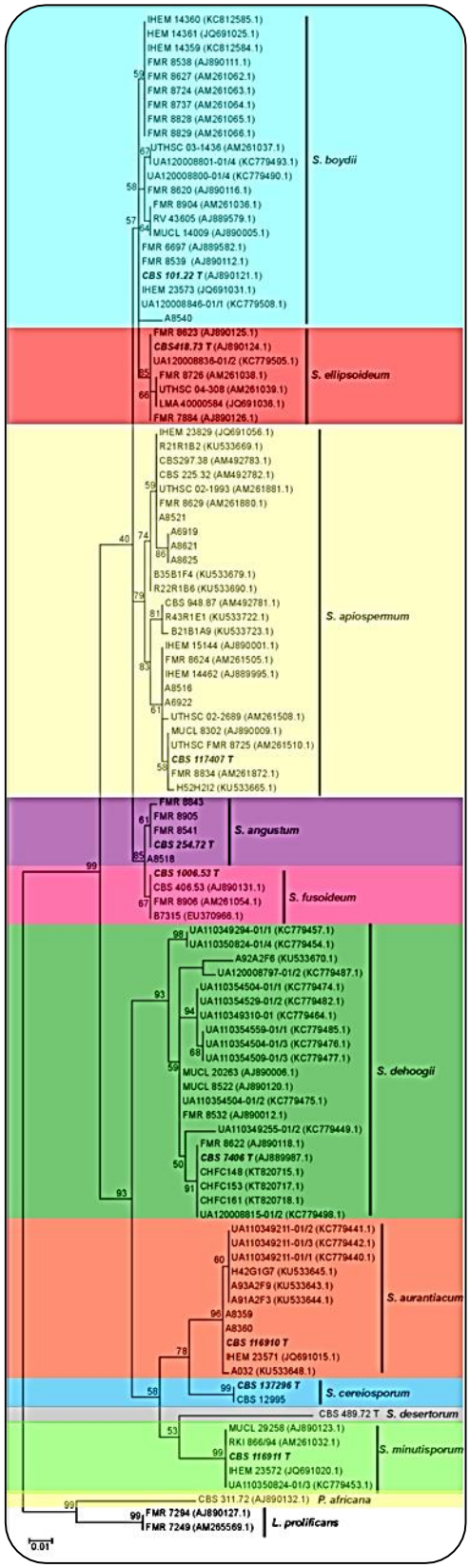


Figure 15: Phylogénie des *Scedosporium* basé sur l'analyse des séquences du locus TUB du gène de la β-tubuline (Ramirez-Garcia *et al.* 2017b)

Les valeurs de bootstrap sont indiquées au niveau des nœuds. Les souches types sont signalées en italiques.

Plusieurs études se sont attachées à démontrer l'existence d'un lien entre l'abondance des *Scedosporium* et l'impact de l'homme sur l'environnement. Leur isolement est associé le plus souvent à des substrats riches en nutriments (Ajello 1952; Sotgiu *et al.* 1966). Ils sont retrouvés dans les zones agricoles, les zones industrielles, les parcs et aires de jeux (Janda-Ulfig *et al.* 2008; Kaltseis *et al.* 2009; Harun *et al.* 2010; Rougeron *et al.* 2015). L'isolement de ces champignons dans les zones polluées est en lien avec la capacité de ces champignons à dégrader les hydrocarbures aliphatiques (April *et al.* 1998) ou aromatiques (Claussen et Schmidt 1998, 1999). Cette capacité a été exploitée dans deux brevets à des fins de biorémédiation appliquée à des effluents d'élevage (Laugero et Tillier 2008) et des effluents riches en matières organiques (Berthon et Grizard 2004). De plus une corrélation a pu être établie entre l'abondance des *Scedosporium* et la concentration en hydrocarbures (Rainer *et al.* 2008). Les *Scedosporium* sont des champignons filamenteux thermotolérants, capables de survivre dans des milieux peu aérés et de forte pression osmotique ; ils sont ainsi capables de survivre dans des milieux salins, avec une concentration en chlorure de sodium pouvant atteindre 5% (Guarro *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2008). Les *Scedosporium* sont absents dans les sols acides comme ceux des forêts, ainsi que dans les sols basiques comme le sable des plages (Rougeron *et al.* 2015), et la fréquence d'isolement des *Scedosporium* est d'autant plus élevée que la concentration en ammonium des sols est plus forte (Kaltseis *et al.* 2009).

La distribution des espèces du genre *Scedosporium* est variable d'un pays à l'autre, mais aussi entre différentes régions (Kaltseis *et al.* 2009; Harun *et al.* 2010). L'étude de Kaltseis *et al.* (2009), menée en Autriche et au Pays-Bas, montrait une forte densité de *Scedosporium* dans les zones industrielles (641 UFC/g de sol), dans les parcs et aires de jeux (388 UFC/g) et dans les zones agricoles (25 UFC/g). La distribution des espèces du genre *Scedosporium* a été déterminée dans ces trois environnements : elle montre une large prédominance de *S. apiospermum* et *S. dehoogii* quelque soit l'habitat étudié, alors qu'en clinique les espèces les plus fréquentes sont *S. apiospermum* et *S. boydii* **(Figure 16)**. En Autriche et aux Pays-Bas, *S. boydii* est par contre peu fréquent dans l'environnement. Fait intéressant, une fréquence d'isolement un peu plus importante est observée pour *S. minutisporum* dans les zones industrielles (Kaltseis *et al.* 2009) **(Figure 16)**.

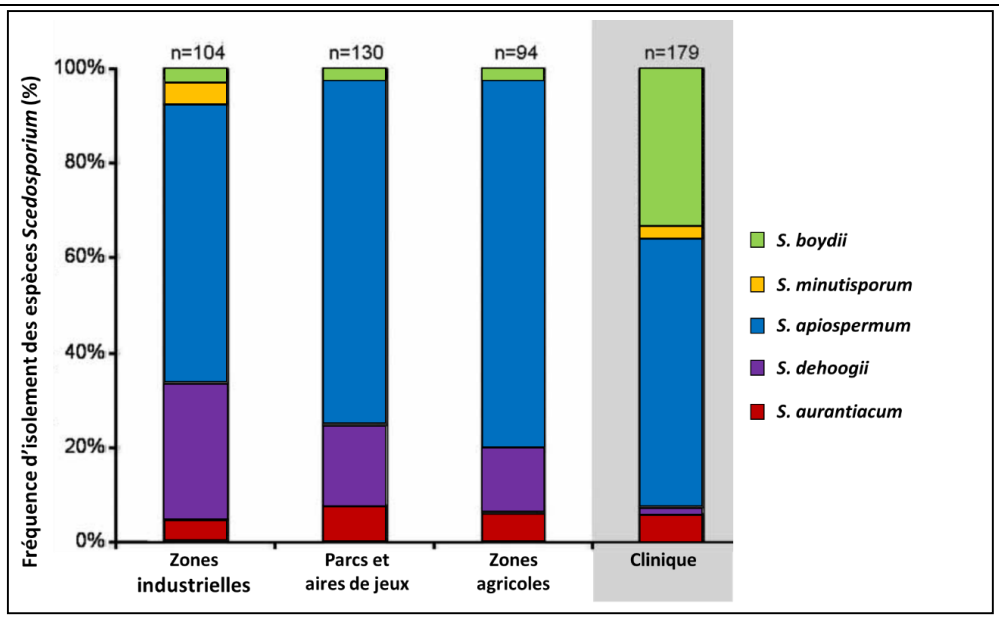


Figure 16: Fréquence d'isolement des espèces du genre *Scedosporium* dans les sols Autrichiens et Néerlandais, d'après Kaltseis *et al.* (2009)

La distribution des espèces du genre *Scedosporium* est différente en Australie, avec une proportion importante de *S. aurantiacum* dans l'environnement (n = 194) comparé aux résultats de Kaltseis *et al.* (2009), et une très faible fréquence d'isolement de *S. boydii et S. dehoogii* correspondant respectivement à 7 et 1 isolats sur 202 isolats de *Scedosporium* (Harun *et al.* 2010).

Dans l'ouest de la France, Rougeron *et al.* (2015) ont retrouvé des isolats de *Scedosporium* à partir de 48 des 119 échantillons de sols analysés, soit une fréquence de 40% dans l'environnement. Leur répartition a été étudiée dans différents environnements, ils sont très abondants dans les zones agricoles où ils sont retrouvés dans 92% des échantillons analysés. Ils sont aussi fréquemment isolés dans les aires de jeux (60%), les stations de traitement des eaux usées (60%), les zones industrielles (50%), les berges de la Mayenne (50%) et de la Loire (47%), et les parcs urbains (40%). Ils sont fréquemment isolés sur les rivages du bord de l'atlantique et dans les vignes **(Figure 17)**. L'étude de la répartition de chacune des espèces montre une forte diversité entre les différents types de sols : *S. dehoogii* est l'espèce la plus fréquente dans tous les types de sols étudiés, avec une fréquence de 40%. *Scedosporium aurantiacum, S. boydii* et *S. apiospermum* sont retrouvés avec des fréquences similaires, respectivement de 21,6%, 20% et 18%, alors que *S. minutisporum* n'a été retrouvé que dans un seul échantillon de terre provenant d'une aire de jeux. Selon les différents environnements étudiés, il existe des variations de fréquence entre les espèces, certains environnements ne sont composés que de deux espèces. C'est le cas des rives de bord de mer pour lesquels seuls *S. dehoogii* et *S. boydii* ont été isolés, *S. boydii* correspondant alors à 85% des isolements. C'est aussi le cas des échantillons provenant de vignes dans lesquelles on retrouve une proportion similaire de *S. apiospermum* et *S. boydii.* Dans les zones agricoles, comme sur les berges de la Loire et de la Mayenne, la situation est différente, avec une majorité de *S. aurantiacum,* représentant respectivement 44%, 50% et 55% des isolats de *Scedosporium*. Dans les aires de jeux, ce sont

majoritairement des isolats de *S. apiospermum* (58%) qui sont identifiés, alors que dans les parcs urbains *S. dehoogii* représente 39% des isolats de *Scedosporium* (Rougeron *et al.* 2015) **(Figure 18)**. En raison de leur présence dans ces différents environnements, ces champignons sont capables de coloniser de manière asymptomatique les cavités de nombreux animaux et d'entraîner des infections chez différentes espèces animales (Gugnani 1972; de Hoog *et al.* 1994; Cabañes *et al.* 1998; Haulena *et al.* 2002; Coleman et Robson 2005; Caro-Vadillo *et al.* 2005; Singh *et al.* 2007; Hugnet *et al.* 2009; Elad *et al.* 2010; Leperlier *et al.* 2010; Elad 2011; Berzina *et al.* 2011; Maslen et Peel 2011; Newton 2012; McCowan *et al.* 2014; Kochenburger *et al.* 2017), mais aussi chez l'homme (Bakerspigel et Schaus 1984).

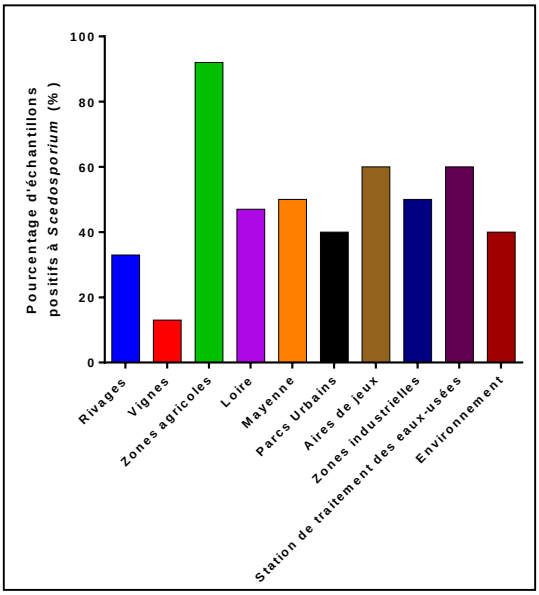


Figure 17: Fréquence des *Scedosporium* dans l'ouest de la France en fonction des types de sols, d'après Rougeron *et al.* (2015)

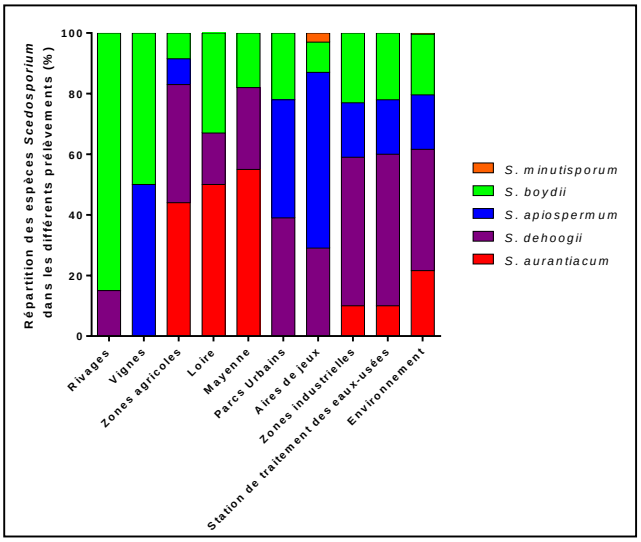


Figure 18: Répartition des espèces du genre *Scedosporium* dans l'ouest de la France en fonction des types de sols, d'après Rougeron *et al.* (2015)

Ces champignons sont également présents dans l'habitat. Deux études menées sur les plantes en pot ont permis de les identifier comme des réservoirs de *Scedosporium* et comme sources potentielles de contamination des patients : Summerbell *et al*. (1989) ont démontré la présence de ces champignons dans la terre des plantes en pot en milieu hospitalier. Concernant l'environnement domestique, Sidot *et al.* (2007) ont réalisé une enquête environnementale au domicile de six patients atteints de mucoviscidose et colonisés par *Scedosporium* sp. Tous les prélèvements d'air et d'eau se sont révélés négatifs en culture ; de même, un seul prélèvement de surface s'est révélé positif à *Scedosporium* alors que 72% des plantes en pot prélevées ont produit en culture des colonies de *Scedosporium*. Les plantes en pot représentent un risque de contamination pour les patients atteints de mucoviscidose.

2.4. Les scédosporioses

Les *Scedosporium* sont des pathogènes opportunistes responsables d'infections aussi bien chez des individus immunocompétents que chez l'immunodéprimé. Ces infections sont cependant plus fréquentes chez des patients immunocompromis (Husain *et al.* 2005; Guarro *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2008; Delhaes *et al.* 2008; Heath *et al.* 2009). Les *Scedosporium* ont une distribution mondiale avec cependant des variations géographiques dans les espèces prédominantes. Alors que *S. apiospermum* et *S. boydii* sont habituellement les espèces majoritaires (Husain *et al.* 2005; Heath *et al.* 2009), *S. aurantiacum* prédomine en Australie (Delhaes *et al.* 2008; Heath *et al.* 2009; Blyth *et al.* 2010a), aux Pays-Bas (Kooijman *et al.* 2007) et au Japon (Nakamura *et al.* 2013).

Les manifestations cliniques des scédosporioses sont dépendantes de la porte d'entrée et du statut immunitaire des patients. Les modes de contamination des patients par ces champignons n'est pas encore parfaitement connu, notamment pour les colonisations/infections pulmonaires. La contamination s'effectuerait par inhalation de spores aéroportées, cependant les champignons du genre *Scedosporium* ne sont qu'exceptionnellement décrits dans les prélèvements d'air. La contamination peut aussi se faire par voie cutanée ou transcutanée, par inoculation traumatique d'éléments fongiques (épines, échardes de bois, abrasions ou blessures avec des outils de jardinage ou agricoles). Le cas des scédosporioses cérébrales sur pseudo-noyade est particulier : elles sont liées à l'inhalation accidentelle (accident de la route, tsunami) d'eau stagnante contenant des éléments fongiques (Cortez *et al.* 2008).

L'analyse bibliographique des infections à *Scedosporium* montre qu'il existerait des facteurs favorisants, comme l'existence de cavités pulmonaires préexistantes (caverne tuberculeuse), et les déficits immunitaires associés notamment à une corticothérapie ou faisant suite à une transplantation.

Trois types d'infections liées à *Scedosporium* sont connus :

- Infections localisées faisant suite à une inoculation traumatique
- Colonisations/infections pulmonaires
- Infections systémiques invasives

2.4.1. Les infections localisées faisant suite à une inoculation traumatique

Ces infections sont principalement rencontrées chez des individus immunocompétents ; chez l'immunodéprimé, elles peuvent devenir invasives, voire disséminées.

a) Les mycétomes

Les mycétomes sont des infections granulomateuses chroniques affectant la peau et les tissus sous-cutanés. Ces infections siègent principalement aux membres inférieurs (pied, jambe), et peuvent s'étendre par contiguité aux articulations ou au tissu osseux. Au cours de ces infections, il y aurait sécrétion d'une substance anesthésique inhibant la douleur (Jimenez et Salvo 2011).

Deux types de mycétomes sont reconnus : les actinomycétomes, qui représentent 60% des mycétomes, sont dus à des bactéries (notamment *Nocardia brasiliensis*) alors que les eumycétomes sont causés par des champignons filamenteux, notamment les *Scedosporium* qui sont à l'origine de 0,6% à 10% des mycétomes (Cortez *et al.* 2008; Jimenez et Salvo 2011; Bonifaz *et al.* 2014).

Ces mycoses sont caractérisées par une progression lente, influencée par la taille de l'inoculum, le statut immunitaire, mais aussi les hormones sexuelles. Dans cette forme clinique, des nodules granulomateux contenant des grains dus à la compaction du mycélium sont décrits au sein d'un liquide visqueux et purulent, et associés à une nécrose locale et tuméfaction (Guarro *et al.* 2006). Les *Scedosporium* sont les agents de mycétomes fongiques les plus fréquents en Europe et aux USA (Uenotsuchi *et al.* 2005; Cortez *et al.* 2008; Harun *et al.* 2009; Heath *et al.* 2009; Tóth *et al.* 2017). D'autres cas ont été rapportés au Brésil (Oliveira *et al.* 2013; Sampaio *et al.* 2017), en Inde (Gupta *et al.* 2013) et au Mexique (Bonifaz *et al.* 2014). Le traitement de ces infections dues principalement à *S. boydii* (Queiroz-Telles *et al.* 2003) repose le plus souvent sur l'ablation chirurgicale de la lésion avec un drainage du pus et un traitement antifongique associé, à base d'itraconazole notamment (Jimenez et Salvo 2011; Tóth *et al.* 2017).

b) Les arthrites et ostéomyélites

Les arthrites et ostéomyélites sont le plus souvent consécutives à une inoculation traumatique ou chirurgicale d'éléments fongiques. Les arthrites siègent principalement au niveau des genoux et des coudes. Les ostéomyélites se traduisent par une infection sous-cutanée associée à la destruction du tissu osseux. Elles se déclarent quelques mois à plusieurs années après le traumatisme. Le diagnostic de ces infections est donc difficile, d'autant que les cultures peuvent être négatives (Guarro *et al.* 2006). Selon une revue de la littérature réalisée par Taj-Aldeen *et al.* (2015) et recensant les infections ostéo-articulaires, les *Scedosporium* se situent au deuxième rang parmi les moisissures en cause. La plupart du temps, ces infections sont dues à *S. apiospermum* et *S. boydii* (seuls deux cas ont été publiés dus à *S. aurantiacum* et *S. fusoidea*). Dans 54,5% des cas, ces infections font suite à une inoculation traumatique, et dans 24,8% des cas elles sont consécutives à une dissémination hématogène. Dans 69,3% des cas, les patients atteints d'infections ostéo-articulaires ont bénéficié d'un traitement chirurgical associé à la prise

d'antifongique (Kooijman *et al.* 2007; Gottesman-Yekutieli *et al.* 2011; Lackner *et al.* 2011a; Ramos Martínez *et al.* 2012; Taj-Aldeen *et al.* 2015; Koehler *et al.* 2016). Chez les patients immunodéprimés, ces infections peuvent être à l'origine d'une infection disséminée.

c) Les infections oculaires

Les *Scedosporium* sont responsables d'infections oculaires faisant suite à la pénétration d'un corps étranger de manière traumatique, ou consécutives à une intervention chirurgicale. Ces infections sont retrouvées chez des individus immunocompétents, avec des ulcérations douloureuses et purulentes de la cornée, et souvent une diminution de l'acuité visuelle et une photophobie, associées à une rougeur et à une sécrétion lacrymale importante (Guarro *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2008). Ces infections peuvent toucher n'importe quelle partie de l'œil : on décrit des kératites (Mancini *et al.* 2005; Xie *et al.* 2006; Ponchel *et al.* 2007; Al-Badriyeh *et al.* 2009; Fadzillah *et al.* 2013; Kepez Yildiz *et al.* 2014; Palanisamy *et al.* 2015), des rétinites (Kiratli *et al.* 2001), des endophtalmies (Zarkovic et Guest 2007; Fernandez-Flores *et al.* 2016; Vanzzini-Zago *et al.* 2016), mais aussi des infections de l'orbite. Ces infections sont rares: selon Xie *et al.* (2006), les kératites à *Scedosporium* représentent 0,8% des cas de kératites (Xie *et al.* 2006). Ces infections sont dues en règle générale à *S. apiospermum*, cependant récemment un cas d'ophtalmie à *S. dehoogii* a été décrit en Chine (Chen *et al.* 2014). Chez les patients immunodéprimés, des atteintes oculaires sont fréquemment observées en cas de dissémination hématogène du champignon.

2.4.2. Les colonisations pulmonaires

Les colonisations/infections pulmonaires sont observées chez des patients présentant des bronchectasies, des bronchopneumopathies chroniques obstructives, une cavité séquellaire de tuberculose, ou encore au cours de la sarcoïdose ou de la mucoviscidose. Kantarcioglu *et al.* (2012) ont analysé les cas publiés entre 1955 et 2010 : 189 cas avaient été décrits, dont 51 (27%) correspondaient à des colonisations/infections pulmonaires non invasives à *Scedosporium.* Cinq d'entre elles étaient identifiées comme des scédosporioses broncho-pulmonaires allergiques, 18 comme des mycétomes pulmonaires et les boules fongiques à *Scedosporium* représentaient 28 cas (Kantarcioglu *et al.* 2012). Bien que la plupart des études n'aient pas permis de détecter dans l'air *Scedosporium*, la contamination des voies respiratoires se ferait par l'inhalation de spores qui ne seraient pas éliminées par la clairance muco-ciliaire et/ou les phagocytes alvéolaires.

a) Les boules fongiques pulmonaires ou pseudalleschériomes

Les boules fongiques pulmonaires sont des masses fongiques similaires à celles induites par *A. fumigatus* dans des cavités préexistantes (caverne tuberculeuse, bronche dilatée, …). Ces masses fongiques correspondent à un agglomérat d'hyphes, de mucus bronchiques et de débris cellulaires. Elles peuvent être visualisées par examen radiologique (Guarro *et al.* 2006; Kantarcioglu *et al.* 2012). Le diagnostic biologique de ces infections est difficile car dans la majorité des cas les cultures sont négatives.

Le diagnostic repose sur la présence de précipitines sériques, et le traitement repose sur l'exérese chirurgicale (Severo *et al.* 2004; Guarro *et al.* 2006; Kantarcioglu *et al.* 2012).

b) Les scédosporioses broncho-pulmonaires allergiques ou ABPM

Le premier cas de scédosporiose broncho-pulmonaire allergique a été décrit en 1976, mais c'est à partir des années 90 que le nombre de cas rapportés a commencé à augmenter (Rippon et Carmichael 1976; Lake *et al.* 1990; Chabasse *et al.* 1991; Miller *et al.* 1993; Cimon *et al.* 2000a; Vázquez-Tsuji *et al.* 2006; Kantarcioglu *et al.* 2012). Peu de données sur le statut sérologique et allergique des patients atteints d'ABPM sont connues, cette affection est le plus souvent associée à l'asthme chronique ou la mucoviscidose. Sur une cohorte de 128 patients atteints de mucoviscidose, Cimon *et al.* (2000a) ont identifié deux patients atteints d'ABPM. Lake *et al*. (1990) ont décrit un cas d'ABPM à *Scedosporium* associé à *A. fumigatus.*

2.4.3. Les infections systémiques invasives

Les infections systémiques invasives surviennent généralement dans un contexte de déficit immunitaire. Ces infections concernent les poumons et sinus (24% des scédosporioses), le système nerveux central (20%), les os (18%) et dans 21% des cas une infection disséminée est retrouvée (Troke *et al.* 2008). Dans la majorité des cas (65%), ces infections sont engendrées par *S. apiospermum* (Troke *et al.* 2008).

a) Les scédosporioses pulmonaires invasives

Les scédosporioses pulmonaires invasives sont relativement rares (Sarva *et al.* 2010; Tortorano *et al.* 2012; Kantarcioglu *et al.* 2012; Montagna *et al.* 2013; Rahman *et al.* 2016). Une revue de Kantarcioglu *et al*. (2012) recensant les cas de colonisation/infection pulmonaire publiés entre 1955 et 2010, faisait état de pneumonies (94 cas), de pneumonies nécrosantes associées à un abcès (18 cas) ou à une cavité (10 cas), et de bronchopneumonies (4 cas). Parmi les facteurs prédisposants, il faut citer les leucémies myéloïdes aigues, les transplantations d'organes (poumons notamment), la corticothérapie, et les pneumonies bactériennes. Ces infections sont majoritairement retrouvées aux Etats-Unis et sont occasionnelles en Europe, Australie, au Congo, Japon et en Thaïlande. Elles sont caractérisées par la présence d'infarctus hémorragiques au niveau du parenchyme pulmonaire qui vont entraîner une dissémination hématogène. Le diagnostic repose sur des examens histologiques et culturaux. Malgré l'administration d'antifongiques seuls (73 cas) ou associés à une chirurgie (10 cas) ou la réalisation d'une intervention chirurgicale isolée (6 cas), ces infections sont souvent fatales, avec un taux de mortalité de 57,2%, en particulier en cas de pneumonie nécrosante avec abcès (Horré *et al.* 2010; Kantarcioglu *et al.* 2012).

b) Les infections disséminées

Les infections disséminées sont associées à un déficit immunitaire sévère : leucémies lymphoïdes ou myéloïdes chroniques (McKelvie *et al.* 2001; Ochiai *et al.* 2003; Harrison *et al.* 2012; Campa-Thompson

et al. 2014), cancers, lupus, greffe de moelle osseuse ou transplantation d'organes (Husain *et al.* 2005; Hartmann *et al.* 2013; Agatha *et al.* 2014; Balandin *et al.* 2016). Husain *et al.* (2005) ont analysé 80 cas d'infections disséminées survenus après transplantation entre 1985 et 2003, 57 faisaient suite à une transplantation d'organes : rénale dans 35% des cas, cardiaque dans 16% des cas, hépatique dans 18% des cas, et pulmonaire dans 14% des cas. Dans 83% des cas, ces infections étaient dues à *S. apiospermum* (mais cette étude date d'avant la révision taxonomique du genre *Scedosporium*), et le taux de mortalité était de 54,5%. Une publication plus récente de Balandin *et al.* (2016) rapporte le développement d'une infection disséminée à *Scedosporium* dans 15 à 55% des transplantations, avec un taux de létalité de 80%. Le pronostic de ces infections est en effet très sombre car leur évolution est très rapide, et le diagnostic biologique très difficile. En dépit de la dissémination hématogène, les hémocultures sont généralement négatives.

c) Les atteintes du système nerveux central

Il a été démontré que *S. apiospermum* avait un neurotropisme, qui pourrait être dû à l'abondance de fer au niveau cérébral. Les atteintes du système nerveux central sont majoritairement caractérisées par la présence d'abcès, retrouvés dans 76,9% des cas, et de méningites (Kantarcioglu *et al.* 2008). Cliniquement, les patients signalent des maux de tête, des parésies faciales, des vertiges, des nausées et une raideur de la nuque. Ces infections sont fatales dans 76% des cas.

Des facteurs de risque ont été identifiés comme l'immunosuppression (37%) et les presque-noyades (28,2%), mais dans 15,4% des cas on ne retrouve aucun facteur de risque (Nesky *et al.* 2000). Kantarcioglu *et al*. (2008) ont répertorié les atteintes du système nerveux publiées depuis 1948, dans 44% des 98 cas répertoriés, ces infections se développent chez des individus sains, notamment en cas de pseudo-noyade. Là encore le taux de mortalité était très élevé, de 74% (Kantarcioglu *et al.* 2008).

Les atteintes du système nerveux central faisant suite à une pseudo-noyade sont retrouvées chez des patients immunocompétents (Buzina *et al.* 2006; Gopinath *et al.* 2010; Horré *et al.* 2010; Nakamura *et al.* 2013; Chen *et al.* 2016; Signore *et al.* 2017). Une revue sur les pseudo-noyades, prenant en compte les 23 cas documentés, montrait une répartition comparable entre les Etats-Unis et l'Europe. Dans la majorité des cas, ces infections faisaient suite à un accident de la route. Sur 23 cas, 14 ont présenté des abcès multiples au niveau cérébral (Katragkou *et al.* 2007). Ces infections sont principalement dues à *S. apiospermum, S. boydii* et *S. aurantiacum.*

2.5. Facteurs de pathogénicité

Peu d'informations sur les facteurs de pathogénicité des *Scedosporium* étaient disponibles jusqu'à ces dernières années, notamment en raison de l'absence de données génomiques pour ces champignons. Le séquençage du génome d'un isolat clinique de *S. apiospermum* (Vandeputte *et al.* 2014), puis d'un isolat environnemental de *S. aurantiacum* (Pérez-Bercoff *et al.* 2015) et d'un isolat clinique de *S. boydii* (Duvaux *et al.* 2017) devrait permettre des progres plus rapides dans ce domaine.

Les facteurs de pathogénicité, à l'origine de la capacité des pathogènes à se multiplier chez l'hôte, peuvent être regroupés selon différentes étapes du processus infectieux, notamment l'adhésion aux tissus de l'hôte, l'invasion tissulaire, l'échappement à la réponse immunitaire et la captation du fer extracellulaire.

2.5.1. Les métalloprotéases et sérine-protéases

Ces protéines sont à l'origine de la dégradation des tissus de l'hôte. Elles sont donc impliquées dans l'adhésion et l'invasion tissulaire, comme dans l'échappement à la réponse immunitaire. Larcher *et al.* (1996) ont décrit la sécrétion par *S. boydii* d'une sérine protéase de 33 kDa de type subtilisine capable de cliver le fibrinogène et potentiellement impliquée dans la pathogénicité de ce champignon.

Da Silva *et al.* (2006) ont décrit la sécrétion par *S. boydii* de 12 polypeptides doués d'une activité protéolytique. Deux de ces peptidases ont été identifiées comme des métallopeptidases capables de dégrader la fibronectine et la laminine, mais pas le collagène, qui pourraient être impliquées dans l'invasion tissulaire. Ces protéines clivent les immunoglobulines G et interférent avec la réponse humorale (Silva *et al.* 2006). Elles interviendraient également dans la germination, puisque l'utilisation d'inhibiteurs des métalloprotéases inhibe la germination des conidies (Silva *et al.* 2011; da Silva *et al.* 2012).

De plus, il a été démontré chez *S. apiospermum* la sécrétion de six protéases (Pereira *et al.* 2009), de même que chez *S. aurantiacum* (Han *et al.* 2017). Pour ce dernier, ces protéases sont produites lors de la culture du champignon dans un milieu reproduisant le mucus bronchique des patients atteints de mucoviscidose (Han *et al.* 2017).

2.5.2. Les sidérophores

Les sidérophores participent à la pathogénicité des champignons en chélatant le fer extracellulaire et en permettant ainsi sa pénétration dans les cellules fongiques. Ces molécules sont sécrétées en condition de stress. Bertrand *et al.* (2009, 2010) ont identifié chez *S. boydii* deux sidérophores de la famille des hydroxamates, l'acide dimérumique et le N^{α}-methyl coprogène B. Ce dernier est spécifique des *Scedosporium,* et produit de manière préférentielle par les isolats cliniques pulmonaires. Le N^{α}-methyl coprogène B serait un marqueur de la colonisation des voies respiratoires par *Scedosporium* (Bertrand *et al.* 2010).

2.5.3. Les composants de la paroi cellulaire

Ghamrawi *et al.* (2015) ont démontré qu'il existait des différences d'expression des protéines chez *S. boydii* en fonction du stade morphologique. Certaines protéines ne sont retrouvées que chez les spores, d'autres uniquement chez les tubes germinatifs, et d'autres encore sont communes aux deux stades morphologiques. Parmi les protéines à ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI), 10 sont associées à la membrane des tubes germinatifs, mais une de ces protéines, une Cu/Zn-SOD, est spécifique des spores (Ghamrawi *et al.* 2015). De plus, l'étude de spores provenant de cultures d'âge variable montre des

différences dans la teneur de la paroi en mélanine. La paroi des spores de *S. boydii* est recouverte de mélanine et d'hydrophobines de classe II (ces protéines modérément hydrophobes ne s'assemblent pas en rodlets) qui permettraient l'échappement des spores aux défenses de l'hôte (Ghamrawi *et al.* 2014).

Des peptidorhamnomannanes ont été identifiés. Ils participeraient à l'adhésion, et à l'endocytose par les cellules épithéliales et les macrophages (Pinto *et al.* 2004; Santos *et al.* 2009; Xisto *et al.* 2016). Il leur est également attribué un rôle dans la virulence, par inhibition de la réponse inflammatoire (Xisto *et al.* 2016). Ces molécules immunogènes (Pinto *et al.* 2001) seraient cependant reconnues par les TLR4 (Figueiredo *et al.* 2010). Enfin, des α-glucanes ont été décrits à la surface de *S. boydii* et seraient impliqués dans la reconnaissance par les TLR4 et l'activation de la réponse immunitaire chez l'hôte (Bittencourt *et al.* 2006).

2.5.4. Les enzymes impliquées dans la réponse contre le stress oxydatif

L'un des premiers mécanismes de défense mis en jeu par les cellules phagocytaires face aux pathogènes consiste dans la libération d'espèces oxygénées réactives (ROS). Il a été démontré que *S. apiospermum* induisait la libération de ROS par les leucocytes (Gil-Lamaignere *et al.* 2003). Une Cu/Zn-superoxyde dismutase (SOD) cytosolique et trois catalases ont été identifiées chez *S. boydii* (Lima *et al.* 2007; Mina *et al.* 2015a,b). La superoxyde dismutase (SodC) et une catalase mycélienne appelée catalase A1 ont été purifiées et caractérisées (Lima *et al.* 2007; Mina *et al.* 2015b). Deux autres protéines connues chez d'autres pathogènes comme participant à la protection contre le stress oxydatif, une peroxyrédoxine et une Mn-SOD, sont reconnues par le sérum de patients infectés par *Scedosporium* (da Silva *et al.* 2012). Ces protéines pourraient être impliquées dans la pathogénicité.

2.5.5. Les autres composants

Des céramides monohexosides, plus particulièrement des glucosylcéramides, ont été décrits chez *S. boydii*. Ces composés sont reconnus par le sérum de lapins infectés et participent à la différenciation du champignon (Pinto *et al.* 2002; Santos *et al.* 2009). Des glucosylcéramides ont aussi été décrits chez *S. apiospermum* ; ils joueraient un rôle dans la croissance du champignon, dans la différenciation et le pouvoir infectieux (Pinto *et al.* 2002; Rollin-Pinheiro *et al.* 2014; Calixto *et al.* 2016). Des ecto-phosphatases ont également été détectées dans le mycélium de *S. boydii* (Kiffer-Moreira *et al.* 2007) ; ces enzymes pourraient participer à l'adhésion et à l'endocytose comme cela a été démontré chez d'autres pathogènes.

Enfin, Raggam *et al.* (2011) ont décrit la présence chez *S. apiospermum* d'une protéine de choc thermique (Hsp60), induite en condition de stress qui pourrait également jouer un rôle dans la pathogénèse des scédosporioses (Raggam *et al.* 2011).

2.6. Méthodes de détection

La détection des *Scedosporium* dans les échantillons biologiques et la détermination de l'espèce sont nécessaires afin de mettre en place un traitement approprié. Actuellement il n'existe pas de méthodes standardisées de détection, et en raison de la croissance lente de ces champignons, il est possible que la fréquence des *Scedosporium* soit sous-estimée. Le diagnostic des infections à *Scedosporium* est difficile à établir en raison des similitudes cliniques rencontrées avec d'autres mycoses. L'amélioration des méthodes de détection est donc essentielle.

2.6.1. Les méthodes culturales

Les méthodes culturales actuellement utilisées demande une certaine expertise pour identifier un *Scedosporium* sur la morphologie macroscopique et microscopique des colonies. Elles présentent également un manque de sensibilité ; en effet les *Scedosporium* sont des champignons à croissance lente et leur présence peut être masquée par des germes à croissance plus rapide (Rainer *et al.* 2008). Classiquement, la culture est réalisée sur milieu de Sabouraud additionné d'antibiotiques, mais d'autres milieux ont été développés pour améliorer la sensibilité de l'examen mycologique des prélèvements cliniques ou environnementaux. Deux milieux ont été publiés, le milieu dichloran-rose Bengale-chloramphénicol additionné de bénomyl (Gilgado *et al.* 2005; Sidot *et al.* 2007; Van Grunderbeeck *et al.* 2010), et le milieu Sce-Sel+ qui lui aussi contient du dichloran et du bénomyl (Rainer *et al.* 2008; Kaltseis *et al.* 2009; Blyth *et al.* 2010a). En milieu hospitalier, il est recommandé d'associer un milieu classique de Sabouraud pour rechercher l'ensemble des pathogènes fongiques actuellement connus et un milieu semi-sélectif pour rechercher plus spécifiquement un *Scedosporium*.

2.6.2. L'examen direct

L'examen microscopique direct du prélèvement est particulièrement important devant un échantillon biologique habituellement stérile. Cependant cet examen peut manquer de sensibilité et de spécificité. Dans les années 1990, un anticorps polyclonal fluorescent a été produit permettant la détection de *S. boydii*, mais il manque de spécificité (Kaufman *et al.* 1997).

2.6.3. Les méthodes non culturales

La détection du N^{α}-méthyl coprogène B, par chromatographie liquide haute performance couplée à la spectrométrie de masse, pourrait être utilisée pour le diagnostic de colonisation des voies respiratoires/infections respiratoires à *Scedosporium* (Bertrand *et al.* 2010). Cependant cette technique ne permettrait pas de préciser l'espèce en cause.

Des méthodes moléculaires peuvent également être utilisées en complément des méthodes culturales. Elles permettent une identification précise de l'espèce en cause et un diagnostic précoce, mais pas la différenciation entre colonisation et infections.

Plusieurs techniques de PCR conventionnelles ont été développées pour une détection directe à partir des expectorations :

- Harun *et al.* (2011) ont développé une PCR multiplex ciblant les régions ITS et utilisant des sondes spécifiques d'espèces, qui permet d'identifier *S. aurantiacum* et *S. boydii* avec une sensibilité et une spécificité de 100%. Cette technique applicable sur les expectorations est adaptée à une utilisation en routine.
- Lu *et al*. (2011) ont développé une technique d'identification au cours de laquelle une séquence du gène de la β-tubuline est amplifiée, puis hybridée avec une sonde spécifique d'espèces (Lu *et al.* 2011). Cette technique ne permet cependant pas de détecter *S. dehoogii.*

Castelli *et al*. (2008) ont également développé une PCR en temps réel pour la détection des *Scedosporium*, avec une spécificité et une sensibilité de 100% sur des cultures pures, mais de sensibilité plus faible sur les tissus pulmonaires (97,2%) et le sérum (81,8%) (Castelli *et al.* 2008).

Enfin, une puce oligonucléotidique a été proposée, utilisant des sondes spécifiques d'espèces, et ciblant les régions ITS1 et ITS2 (Bouchara *et al.* 2009). Cette technique qui permet la détection et l'identification directe d'une quinzaine d'espèces fongiques dont les *Scedosporium*, présente une sensibilité supérieure à celle des cultures puisqu'elle permet la détection d'espèces supplémentaires pour 58% des expectorations analysées.

2.6.4. Les méthodes sérologiques

Les méthodes présentées précédemment ne permettent pas de distinguer colonisation et infection. Seule la détection d'anticorps sériques spécifiques permet d'affirmer l'infection (Baxter *et al.* 2013). Une technique d'électrosynérèse utilisant un extrait brut de *S. boydii* est utilisée dans certains laboratoires spécialisés, mais elle manque de spécificité, des réactions croisées pouvant survenir avec les *Aspergillus* (Cimon *et al.* 2000b).

Dernièrement, la catalase A1 purifiée de *S. boydii* a été utilisée pour développer un test ELISA. Cette technique permet de discriminer les sérums de patients infectés par *Scedosporium,* de ceux de patients non colonisés par des champignons, ou infectés par *Aspergillus*. Ce test présente une sensibilité de 100% et une spécificité de 97% (Mina *et al.* 2015a).

2.7. Traitement d'une scédosporiose

Les infections à *Scedosporium* nécessitent une prise en charge thérapeutique adaptée en raison des résistances intrinsèques à de nombreux antifongiques, notamment l'amphotéricine B (Meletiadis *et al.* 2002; Capilla et Guarro 2004; Guarro *et al.* 2006; Gilgado *et al.* 2006; Espinel-Ingroff *et al.* 2008; Nweze et Okafor 2010; Lackner *et al.* 2012; Schemuth *et al.* 2013; Biswas *et al.* 2013; Tortorano *et al.* 2014; Compain *et al.* 2015; Homa *et al.* 2015; Mello *et al.* 2016).

Le traitement de première intention des scédosporioses repose sur le voriconazole (Troke *et al.* 2008; Tortorano *et al.* 2014). De nombreuses études ont démontré l'efficacité de cet antifongique sur les différentes espèces de *Scedosporium in vitro* et *in vivo* dans des modèles animaux (Capilla et Guarro 2004; Guarro *et al.* 2006; Gilgado *et al.* 2006; Espinel-Ingroff *et al.* 2008; Guinea *et al.* 2008; Troke *et al.* 2008; Nweze et Okafor 2010; Lackner *et al.* 2012, 2014a; Lelièvre *et al.* 2013; Schemuth *et al.* 2013; Biswas *et al.* 2013; Tortorano *et al.* 2014; Compain *et al.* 2015; Halliday *et al.* 2016; Alvarez et Sanhueza 2016; Wiederhold *et al.* 2017b; Martin-Vicente *et al.* 2017). L'efficacité du voriconazole est également démontrée par les succès thérapeutiques rapportés dans diverses infections à *Scedosporium* (Musk *et al.* 2006; Borghi *et al.* 2010; Henao-Martínez *et al.* 2013; Rolfe *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2013; Hartmann *et al.* 2013; Holle *et al.* 2014; Patel et Orlandi 2015; Cruz *et al.* 2015; Huguenin *et al.* 2015; Sharma et Singh 2015; Rahman *et al.* 2016; Goldman *et al.* 2016; Chen *et al.* 2016; Denton *et al.* 2016; McLaren et Potter 2016; Mohan et Gopakumar 2016; Rathi *et al.* 2016; Stoneham *et al.* 2017; Zoroquiain *et al.* 2017). Le voriconazole présente cependant des effets indésirables ; il induit notamment une photosensibilité (Rondeau *et al.* 2012). De plus, une résistance au voriconazole est rapportée chez certains isolats de *Scedosporium,* à l'origine d'échecs thérapeutiques (Espinel-Ingroff *et al.* 2008; Troke *et al.* 2008; Homa *et al.* 2015; Martin-Vicente *et al.* 2017).

En cas d'intolérance au voriconazole ou d'échec thérapeutique, il est possible d'utiliser le posaconazole. Le posaconazole présente en effet une certaine efficacité sur les *Scedosporium* (Meletiadis *et al.* 2002; Gilgado *et al.* 2006; Guinea *et al.* 2008; Nweze et Okafor 2010; Lackner *et al.* 2012, 2014a; Lelièvre *et al.* 2013; Biswas *et al.* 2013; Tortorano *et al.* 2014; Wiederhold *et al.* 2017a,b; Halliday *et al.* 2016; Alvarez et Sanhueza 2016; Lass-Flörl et Cuenca-Estrella 2017). Son efficacité a notamment été démontrée dans le traitement d'un abcès cérébral à *Scedosporium* (Mellinghoff *et al.* 2002).

En raison du faible nombre d'antifongiques actifs sur les *Scedosporium*, des associations de voriconazole avec une échinocandine peuvent être envisagées dans les formes sévères (Schemuth *et al.* 2013; Lackner *et al.* 2014a; Compain *et al.* 2015). Des associations avec des molécules à activité antipsychotique présenteraient également une certaine efficacité (Homa *et al.* 2015).

3. Le stress oxydatif

Le développement d'une infection dépend de la capacité des pathogènes à échapper à la reconnaissance par le système immunitaire de l'hôte. Au cours de la réponse immunitaire, les cellules phagocytaires libèrent des composés doués de propriétés antimicrobiennes comme les espèces oxygénées ou azotés réactives. Pour échapper à ce stress oxydatif et nitrique, les pathogènes ont développé différents mécanismes de défense que l'on peut classer en deux groupes :

- les antioxydants non-enzymatiques comme la vitamine E, les caroténoïdes, les métallothionéines, les « scavengers » de radicaux hydroxyl, de l'ascorbate et du glutathion. Ces molécules de faible masse moléculaire sont capables de fixer les ROS et RNS via leurs groupements thiols (Fang 2004; Belozerskaya et Gessler 2007; Gessler *et al.* 2007).
- les antioxydants enzymatiques comme les superoxyde dismutases, les catalases, et les enzymes des systèmes du glutathion et des thiorédoxines (Fang 2004; Belozerskaya et Gessler 2007; Gessler *et al.* 2007; Crawford et Davies 1994).

3.1. ROS et RNS dans la réponse immunitaire

A la suite de la reconnaissance des agents infectieux, une explosion respiratoire se produit dans les cellules phagocytaires, conduisant à la libération de grandes quantités de ROS et RNS. Dès 1962, Karnovsky a associé l'explosion respiratoire à la production d'une quantité importante d'oxydants antimicrobiens par les cellules phagocytaires. En 1984, Babior a démontré que durant l'explosion respiratoire, les phagocytes consommaient 50 fois plus d'oxygène et produisaient ainsi une grande quantité d'anions superoxyde et de peroxyde d'hydrogène (Babior 1984; Campbell et Colgan 2015).

Une fois reconnus par les macrophages, les agents infectieux sont ingérés. Les lysosomes fusionnent avec la vacuole de phagocytose et déversent leur contenu dans le phagolysosome ainsi formé, en particulier des produits antimicrobiens, peptides antimicrobiens, protéases et ROS et RNS (Campbell et Colgan 2015). Les anions superoxyde sont les premiers ROS produits. Ils sont produits via la NAD(P)H oxydase par toutes les cellules (Nathan et Shiloh 2000). Les macrophages produisent des ROS et des RNS, mais ne possèdent pas de myéloperoxydases (Nathan et Shiloh 2000; Fang 2004), alors que les neutrophiles possèdent une myéloperoxydase et de ce fait produisent également de l'acide hypochlorique (Nathan et Shiloh 2000). Chez les souris, la production de RNS est plus importante chez les macrophages que chez les neutrophiles et inversement, la production de ROS est plus importante chez les neutrophiles (Fang 2004). La présence de la NAD(P)H oxydase et de oxyde nitrique synthase chez les phagocytes est essentielle pour la défense contre les pathogènes (Fang 2004).

Il a été démontré qu'il existait une synergie entre les ROS et RNS, avec la production d'espèces cytotoxiques comme le peroxynitrite (Fang 2004). Les RNS (oxyde nitrique notamment) interviennent dans la défense contre de nombreux pathogènes comme *Campilobacter jejuni, Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, et *Toxoplasma gondii* (Iovine *et al.* 2008; Allain *et al.*

2011). Ils sont produits par les macrophages et les neutrophiles, mais aussi les cellules NK, les mastocytes et les cellules dendritiques.

3.2. Les systèmes antioxydants enzymatiques des pathogènes

Le stress oxydatif est un mécanisme de défense développé par les cellules en réponse à des pathogènes et consistant dans la libération de ROS et RNS. Afin de se protéger, les pathogènes ont développé des mécanismes protecteurs permettant le maintien du statut redox. Les bactéries, champignons et parasites mettent en jeu des activités enzymatiques similaires pour échapper au stress oxydatif induit par le système immunitaire. Ces systèmes antioxydants sont considérés comme des facteurs de virulence, et sont pour certaines de ces enzymes utilisées pour le sérodiagnostic de l'infection ou le développement de nouvelles thérapeutiques.

Les systèmes antioxydants enzymatiques développés par différents pathogènes ont fait l'objet d'une revue de la littérature publiée dans *Microbial Pathogenesis.*

Microbial antioxidant defense enzymes

Cindy Staerck[1], Amandine Gastebois[1], Patrick Vandeputte[1,2], Alphonse Calenda[1], Gérald Larcher[1], Louiza Gillmann[1], Nicolas Papon[1], Jean-Philippe Bouchara[1,2], Maxime J.J. Fleury[1]

[1] Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), UNIV. Angers, UNIV. Brest, Université Bretagne - Loire, Angers, France

[2] Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

Publié dans Microbial Pathogenesis, le 15 juin 2017

Résumé

Les radicaux libres sont souvent décrits comme des composés chimiques caractérisés par des électrons libres sur l'orbite externe, leur rendant une haute réactivité. Les espèces réactives oxygénées (ROS) et azotées (RNS) participent à de nombreux processus physiologiques et pathologiques. Ces composés cellulaires sont produits par différents systèmes physiologiques tels que le métabolisme aérobie et jouent un rôle majeur dans les voies de signalisation cellulaire, mais aussi dans la défense immunitaire de l'hôte contre les microorganismes pathogènes.

Les ROS et RNS sont des espèces hautement réactives affectant le potentiel redox, et ayant un effet délétère sur les macromolécules. Pour maintenir le statut rédox, des antioxydants non-enzymatiques ou enzymatiques coordonnent l'équilibre entre la production de ROS et RNS et leur dégradation. Les superoxyde dismutases, les catalases, les enzymes des systèmes du glutathion et de la thiorédoxine, différentes peroxydases, les flavohémoglobines, ainsi que les nitrates et nitrites réductases représentent des antioxydants enzymatiques proéminents permettant la détoxification des ROS et RNS.

Les bactéries, champignons et parasites présentent également des activités enzymatiques similaires pour se protéger contre le stress oxydatif engendré par le système immunitaire. Dans cette revue, nous résumons les connaissances actuelles sur les systèmes enzymatiques qui permettent aux microorganismes de lutter contre les ROS et les RNS. Ces mécanismes sont considérés comme des facteurs de virulence et représentent donc des cibles potentielles pour le diagnostic des infections ou le développement de nouveaux anti-infectieux.

Mots-clés : Stress oxydatif, Détoxification, Antioxydant enzymatique, Défense immunitaire

Microbial Pathogenesis 110 (2017) 56–65

Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

Microbial antioxidant defense enzymes

Cindy Staerck [a], Amandine Gastebois [a, 1], Patrick Vandeputte [a, b, 1], Alphonse Calenda [a, 1], Gérald Larcher [a], Louiza Gillmann [a], Nicolas Papon [a, 1], Jean-Philippe Bouchara [a, b, 1], Maxime J.J. Fleury [a, *, 1]

[a] Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), UNIV. Angers, UNIV. Brest, Université Bretagne - Loire, Angers, France
[b] Laboratoire de Parasitologie Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 27 January 2017
Received in revised form
14 June 2017
Accepted 15 June 2017
Available online 16 June 2017

Keywords:
Oxidative stress
Detoxification
Enzymatic antioxidant
Immune defense
Pathogen evasion

ABSTRACT

Free radicals are often described as chemical compounds characterized by unpaired electrons in their outer orbital rendering them highly reactive species. In mammalians, studies on free radicals were focused on reactive oxygen species (ROS) or reactive nitrogen species (RNS) due to their relative importance in physiological as well as in pathological processes. These cellular compounds are produced by different physiological systems such as the aerobic metabolism and play a major role in cell signaling pathways but also in the host immune defenses against pathogenic microorganisms.

ROS and RNS are highly reactive species with potentially harmful effects on any cellular components (lipids, proteins and nucleic acids) when produced with a high level. To maintain ROS and RNS at a non-toxic concentration, enzymatic and non-enzymatic cellular antioxidants coordinate the balance between their production and their degradation. Superoxide dismutases, catalases, glutathione system, thioredoxin system, peroxidase systems, flavohemoglobins and nitrate or nitrite reductases represent the prominent enzymatic antioxidants used to scavenge excess of internal as well as external ROS and RNS.

Bacteria, fungi and parasites also display similar enzymatic activities to escape the host oxidative defenses during the immune response against infectious processes. Here we summarize current knowledge on the enzymatic systems that allow microorganisms to fight against ROS and RNS, and shed light on the role that take some of them in microbial infections. Such microbial protective systems are considered as virulence factors, and therefore represent key targets for diagnosis of the infections or development of anti-infectious drugs.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction 57
2. The reactive oxygen species 57
3. The reactive nitrogen species 57
4. Production of reactive species during the immune response 58
5. The enzymatic antioxidants 59
   5.1. Bacterial enzymatic antioxidants 59
   5.2. Fungal enzymatic antioxidants 61
   5.3. Parasite enzymatic antioxidants 62
6. Conclusion 62
   References 62

* Corresponding author. Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, EA 3142, Institut de Biologie en Santé-IRIS, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France.
E-mail address: maxime.fleury@univ-angers.fr (M.J.J. Fleury).

[1] AG, PV, AC, NP, JPB and MJJF are members of the ECMM/ISHAM (European Confederation of Medical Mycology/International Society for Human and Animal Mycology) working group *Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis* (*Fri-CF*).

http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.06.015
0882-4010/© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Since 30 years, the interest for free radicals and their role in the oxidative stress has exploded. As soon as 1954, Gershman et al. [1] indicated that the toxicity of oxygen is due to its partial reduction in free radicals, and Schönbein [2] hypothesized that the molecule needs to be activated prior generating biological oxidations. Although previously suggested by various authors, Sies [3] was the first to propose an oxidative stress concept in 1985. The oxidative stress is described as a physiological or a pathophysiological process that relies on an imbalance between the production and the degradation of reactive oxygen species (ROS). It is now associated with the nitrosative stress due to a similar imbalance with reactive nitrogen species (RNS).

The reduction of oxygen leads to the formation of radical species such as superoxide anions ($O_2^{\bullet-}$) and hydroxyl radical (•OH) but also peroxyl ($RO_2^{\bullet}$) and alkoxyl (RO•) radicals which are more reactive oxygen species. Moreover, another well-known ROS, hydrogen peroxide (H_2O_2) is formed from dismutation of superoxide anion. Production of RNS is dependent of the local redox environment and is also mediated by the presence of ROS [4]. The primary RNS is nitric oxide (•NO) which leads to the generation of other RNS by oxidation and particularly to peroxynitrite ($ONOO^-$) [4,5]. ROS and RNS are toxic oxidants because of the presence of unpaired electrons in their external orbitals which renders these molecules highly energetic and highly reactive [1,6–8].

ROS and RNS are produced by a broad range of mechanisms including: (i) the aerobic metabolism generated by the mitochondrial respiratory chain; (ii) UV light, X-rays or gamma-rays irradiations; or (iii) metal-catalyzed reactions. They are also generated by air pollutants, or during the inflammatory process that macrophages and neutrophils drive as a defense system against pathogens [9].

ROS and RNS display a dual role related to their relative production in biological processes. When present with a low level, they are essential for physiological cellular signaling pathways or for numerous physiological processes [4]. However, when present with a high concentration they have harmful effects on essential cellular macromolecules such as proteins, lipids, and nucleic acids [9]. Importantly, immune defenses take advantage of this characteristic since phagocytic cells (macrophages and neutrophils) produce a great amount of ROS/RNS to fight pathogens.

In normal conditions, ROS and RNS are oxidant compounds produced by cellular metabolism pathways that are thereafter counterbalanced by the antioxidant systems in order to maintain the organism integrity [1,3,10]. Three groups of antioxidants must be considered: the first one that prevents the oxidation of macromolecules, the second one that transforms the oxidized molecules into less reactive ones and the third one that chelates metallic compounds to avoid the generation of ROS. Among these antioxidants, two subgroups are currently considered: (i) non-enzymatic antioxidants including vitamin E, carotenoids, metallothioneins, scavenger of hydroxyl radical, ascorbate and glutathione; and (ii) antioxidative enzymes such as superoxide dismutases, catalases, glutathione peroxidases, glutathione reductases, thiol peroxidases, thioredoxins, glutaredoxins and peroxiredoxins [2,4]. The enzymatic antioxidants are produced by human phagocytic cells as well as pathogenic microorganisms to downregulate the oxidative burst response against the infectious agents or to escape the excess of ROS generated by phagocytic cells during the oxidative burst response, respectively.

2. The reactive oxygen species

Among the various systems involved in the production of ROS, the major one is probably the NADPH oxidase although xanthine oxidase from the arachidonic acid pathway also plays an important role.

NADPH oxidase (NOx) is a multimeric membrane-bound enzymatic complex catalyzing the monoelectronic reduction of dioxygen in superoxide anions [$NADPH + 2\ O_2 \rightarrow 2\ O_2^{\bullet-} + H^+ + NADP^+$]. The NADPH oxidase is constitutively expressed and active in all kinds of cells while quite inactive in quiescent phagocytes but rapidly inducible when necessary. Macrophages and neutrophils express a predominant form of NOx, called NOx2, which plays a key role in the host immune response [11–15]. NOx2 is activated during phagocytosis by a complex series of protein/protein interactions involving five other proteins, which permits electron release from NAPDH and its subsequent reaction with dioxygen to form superoxide anions. Thus activation of NOx2 results in the production of superoxide anions with antimicrobial activity which accumulate to some extent in the phagosome.

Xanthine oxidoreductase (XOR), also referred to as xanthine oxidase, is a homodimeric enzyme located especially in the perinuclear region. XOR displays two interconvertible forms, *i.e.* the xanthine dehydrogenase (XDH) and the xanthine oxidase (XO), and is a major source of superoxide and hydrogen peroxide. Superoxide is produced either by the purine metabolism following the oxidation of hypoxanthine or by the subsequent oxidation of xanthine to uric acid during the proinflammatory response to cytokines [4,10]. Therefore XOR is known to play an important role in the innate immunity [4]. Under anaerobic conditions, XOR is a potential source of nitric oxide by reducing the nitrate ions [10].

Various organelles are able to release free radicals such as superoxide anions from mitochondrial cell respiration, and hydrogen peroxide from peroxisome or the smooth endoplasmic reticulum through the cytochrome P_{450} activity [16,17].

Superoxide anions ($O_2^{\bullet}$), known as the primary ROS, are not directly toxic and can react with others molecules generating secondary ROS [7,9,10,16,17]. Superoxide exists into two forms, the form $O_2^{\bullet-}$ slightly toxic in aqueous solution and the protonated form with perhydroxyl radical ($HO_2^{\bullet}$) reported to be more reactive [10,16,17]. While superoxide anions may be converted into hydrogen peroxide (H_2O_2) by dismutation through superoxide dismutases or by spontaneous dismutation, and subsequently in H_2O via catalases, the toxicity of these species may be influenced by the proximity of superoxide and hydrogen peroxide, which participate to the Haber Weiss reaction ($O_2^{\bullet} + H_2O_2 \rightarrow {}^{\bullet}OH + O_2 + {}^-OH$) or of metal ions via the Fenton reaction ($H_2O_2 + Fe^{2+} \rightarrow {}^{\bullet}OH + Fe^{3+} + {}^-OH$) [10], resulting in a more toxic oxygen species, the hydroxyl radical (•OH) [16,17]. The peroxyl radicals (ROO•) are secondary ROS derived from the addition of superoxide to a carbon centered radical, as the hydroperoxyl or perhydroxyl radical. When two peroxyl radicals react together forming unstable elements (tetraoxide, RO_4R), they finally fragment into hydrogen peroxide, peroxide or various hydroxylated compounds. These types of reactions are notably reported to be responsible for lipid peroxidation [9,10].

3. The reactive nitrogen species

Nitric oxide synthases (NOS) are a metalloenzyme family catalyzing nitric oxide formation from oxidation of the amino acid L-arginine leading to the production of L-citrulline. This protein

family is composed of two constitutive isoforms, eNOS (endothelial) and nNOS (neuronal), while another isoform is inducible (iNOS). These proteins display a heminic group and are active under homodimeric forms when associated to Ca^{2+}/calmoduline complexes. The inducible isoform (iNOS) is reported to be produced in response to inflammatory stimuli (LPS, pro-inflammatory cytokines) and in the presence of ROS [10].

In the liposomes, the myeloperoxidase (MPO), a cationic homodimer, is important in the host defense by the chlorination of bacterial proteins [4]. This enzyme is able to produce the strongly bactericidal hypochlorous acid, which results from oxidation of chloride anions in the presence of hydrogen peroxide. In addition, MPO can catalyze oxidation of nitric ions, thus producing RNS. MPO is found in neutrophils, where it accounts for 2–5% of total proteins, as well as in monocytes but not in macrophages. In neutrophils, this enzyme is located in primary granules and it is delivered to the phagosome upon fusion of the granules with the phagosome during phagocytosis.

Nitric oxide (•NO) is considered as the primary RNS. It is a labile molecule that can diffuse across the cytoplasmic membrane. At low concentration, nitric oxide plays a protective role against the oxidative stress by limiting lipid peroxidation and displays an anti-inflammatory activity by limiting the recruitment of leucocytes and by modulating the toxicity of TNFα and LPS. The protonated form of nitric oxide can form nitrate regardless of pH and temperature [9,10]. Nevertheless, nitric oxide may react with thiols to yield S-nitrothiol functions or with iron to form ferrous–nitrosonium (Fe^{2+}–NO^{+}) but also with superoxide to form peroxynitrite ($ONOO^{-}$) [18]. Peroxynitrite is formed from the biradical reaction between superoxide and nitric oxide radical ($•NO + O_2• \rightarrow ONOO^{-}$). Therefore, peroxynitrite is categorized among RNS but also among peroxyl radicals (ROO•). The reaction leading to the formation of peroxynitrite is 5-fold faster than dismutation of superoxide. The formation of peroxinitrite allows detoxification of nitric oxide which is able to diffuse across the cell membrane and therefore has a deleterious effect at distance, the diffusion through the plasma membrane being much more limited for peroxinitrite [9,10,16,17].

4. Production of reactive species during the immune response

During microbial infections, phagocytic cells are able to produce and release a huge quantity of ROS and RNS during a process named “respiratory burst”. In 1962, Karnovsky [19] associated the respiratory burst to the formation of a high amount of lethal oxidant in the antimicrobial response of phagocytes. In 1984, Babior [19] demonstrated that phagocytes consumed 50-fold more oxygen during the respiratory burst to produce a huge quantity of superoxide and hydrogen peroxide.

At the inflammatory site, pathogens are recognized by macrophages or neutrophils, then internalized in these cells which leads to the release in the phagosome of antimicrobial products such as antimicrobial peptides, proteases, and ROS [20]. Macrophages remain the first line of defenses against pathogens [21], they produce ROS and RNS, but they do not constitutively express the myeloperoxidase [4,5]. Even if neutrophils are able to produce RNS and hypochlorous acid [5], RNS production is more important in macrophages than in neutrophils [4]. Conversely, ROS production is more important in neutrophils than in macrophages, and more important in mice than in man [4]. It is assumed that the concentration of superoxide in the neutrophil phagosomes is extremely high with a production of roughly 5–10 nmol/s [21]. NOX and iNOS which are present in macrophages and neutrophils, are essential for the defense against pathogens [4].

The synergy between ROS and RNS is well-documented. ROS and RNS interact in optimizing early microbial killing producing

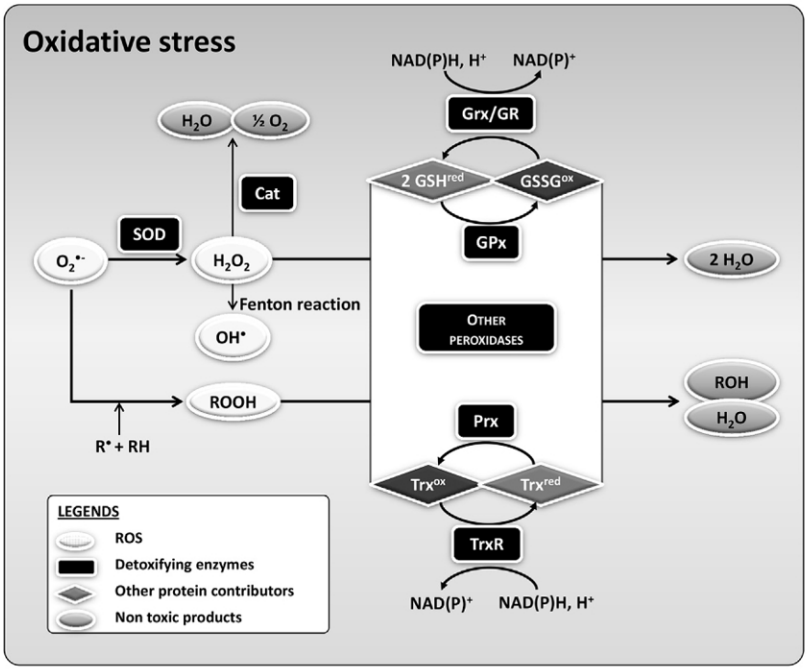


Fig. 1. Enzymatic mechanisms of degradation of ROS.
Cat: Catalase; GPx: Glutathione peroxidase; GR: Glutathione reductase; Grx: Glutaredoxin; GSH^{red}: Reduced glutathione; $GSSG^{ox}$: Oxidized glutathione; Prx: Peroxiredoxin or Thioredoxin peroxidase; SOD: Superoxide dismutase; TrxR: Thioredoxin reductase; Trx^{ox}: Oxidized thioredoxin; Trx^{red}: Reduced thioredoxin.
H_2O_2: Hydrogen peroxide; $O_2^{•-}$: Superoxide anion; $OH^•$: Hydroxyl radical; R•: Radical centered on the carbon; ROH: Alcohol; ROOH: hydroperoxide radical.

highly cytotoxic species such as peroxynitrite [4]. ROS are implicated in the killing of pathogens, while allowing the subsequent production of less cytotoxic RNS to control residual infection until the microorganisms are cleared by adaptive mechanisms [4]. The important role of ROS in the host defense against pathogens is illustrated by the high frequency of infections in patients with chronic granulomatous disease, a genetic disease characterized by a defect in NADPH oxidase [22–25]. RNS species are implicated in the host defense against pathogens including *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes*, *Toxoplasma gondii,* and *Campylobacter jejuni* [26]. RNS are produced in numerous aerobic cells within the immune system such as macrophages, neutrophils, NK cells, mast cells, and dendritic cells. A high production can be reached by many mammalian cells in response to inflammatory stimuli as cytokines and microbial products, especially by macrophages [5,26,27]. RNS have sustained role in limiting the residual bacterial replication and control the inflammatory process in response to hyphal formation for fungi [4]. Nitric oxide acts as an antimicrobial effector, studied most extensively in macrophages [4]. The nitrosative stress genes are induced following phagocytic attacks, and are upregulated in mucosal infections but barely activated during systemic infections [28]. The nitrosative stress response seems to occur predominantly during the early stages of infections by fungi when the pathogens are battling with the host immune defenses [28].

5. The enzymatic antioxidants

The first line of defense against superoxide is the superoxide dismutases (SOD, EC 1.15.1.1), which catalyze dismutation of superoxide in hydrogen peroxide (Fig. 1). Four isoforms of SODs are currently known: Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, Fe-SOD and Ni-SOD [29]. Hydrogen peroxide may then be cleaved in water and oxygen ($2\ H_2O_2 \rightarrow 2\ H_2O + O_2$) by catalases (Cat, EC 1.11.1.6) [2] (Fig. 1). Other enzymatic systems to detoxify hydroperoxide radicals are the glutathione system (Figs. 1 and 2A) and the thioredoxin system (Figs. 1 and 2B). Glutathione system is composed of glutathione peroxidases (GPx, EC 11.11.1.9) [30], glutathione reductases (GR, EC 1.6.4.2) [31,32] and glutaredoxins (Grx, EC 1.15–1.21) [33,34]. Peroxiredoxin (Prx, EC 1.11.1.15) [35,36], thioredoxin (Trx, EC 1.8.1.9) [37] and thioredoxin reductase (TrxR, EC 1.8.1.9) compose the thioredoxin system [36–38]. Other enzymatic systems may also reduce organic hydroperoxide such as cytochrome C peroxidase (CCP, EC 1.11.1.5) (Figs. 1 and 2C). [39,40] and the chloroperoxidase found in fungi exclusively (CPO, EC 1.11.1.10) (Figs. 1 and 2D) [41–43].

RNS degradation involves the flavohemoglobins, nitrate and nitrite reductases (Fig. 3). Nitric oxide is converted in nitrates (NO^-_3) by flavohemoglobins (FHB, EC 1.14.12.17) [44]. Flavohemoglobins belong to globin family [45,46], an ubiquitous group found in all organisms suggesting an ancestral origin [47]. Nitrates are converted in nitrites (NO^-_2) by nitrate reductase also named nitrate oxidoreductase (NR, EC 1.6.6.3) [48]. Finally, nitrites are reduced to ammonium by the nitrite reductase (NiR, EC 1.6.6.4) [48,49].

The establishment of an infection depends on the capacity of microorganisms to elude recognition and to escape killing by the host immune system, particularly the oxidative response of phagocytes, since macrophages and neutrophils release antimicrobial compounds, especially high amounts of ROS and RNS.

To cope with the oxidative and the nitrosative stress, pathogens display different defense mechanisms including antioxidants. Pathogens can fight off the high levels of ROS by the induction of several genes encoding enzymes involved in maintenance of the cellular redox environment [50].

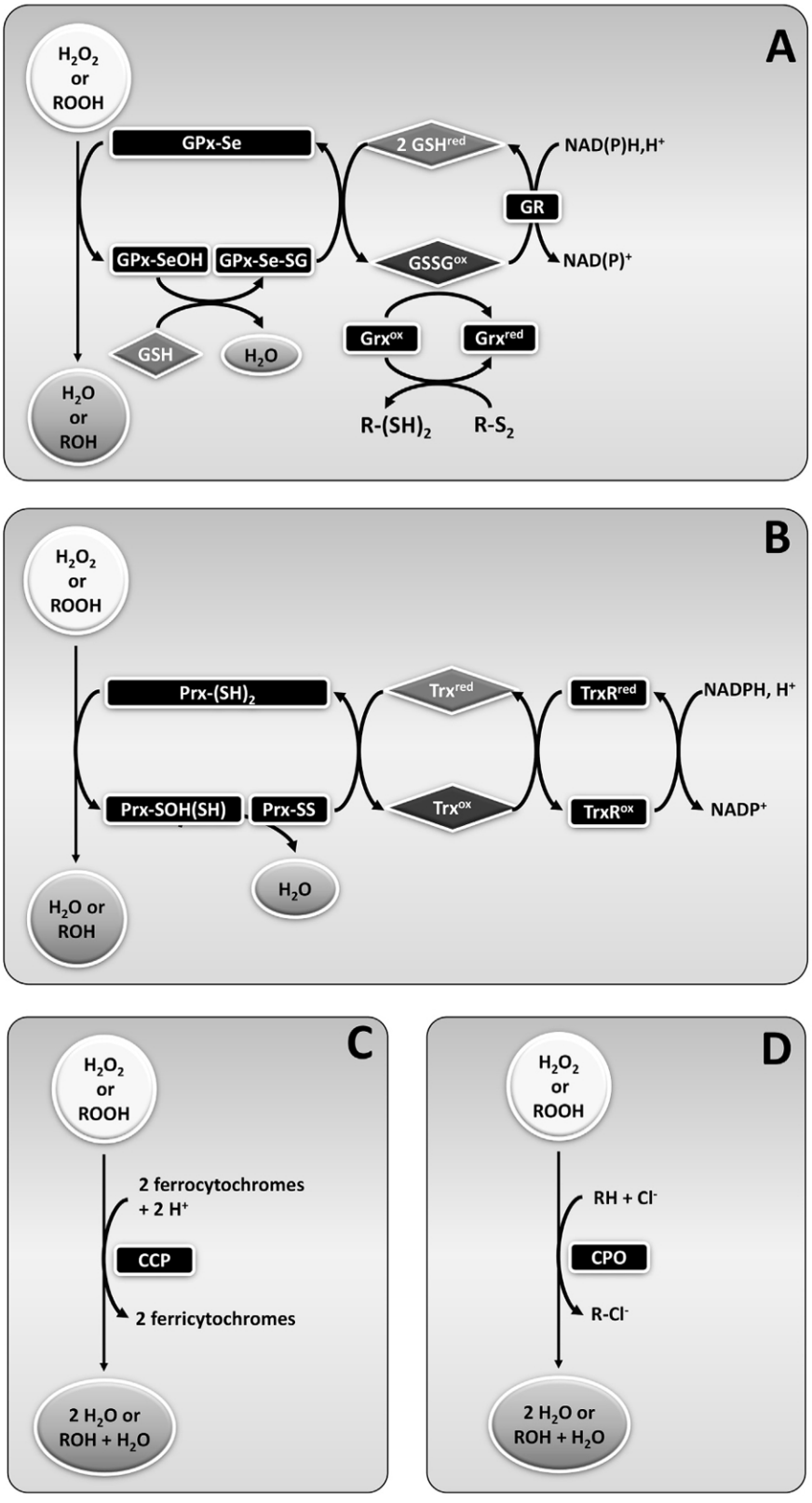
5.1. Bacterial enzymatic antioxidants

Bacterial infections induce an oxidative stress especially during engulfment in phagocytic cells. More precisely, bacteria are submitted to ROS and RNS generated in the phagolysosome and, in consequence, they have developed a battery of enzymes to detoxify these highly toxic compounds.

Superoxide dismutases are the first bacterial enzymes implicated in ROS detoxification, thereby these proteins are of importance for bacteria against various types of oxidative stresses. *Staphylococcus aureus* harbors two genes encoding superoxide dismutases [51,52]. *SodA* gene encodes a Mn-SOD overexpressed in the stationary phase, or in the presence of superoxide anions [53]. An increase in SOD activity was also found when bacteria are confronted to phagocytic cells such as macrophages [54,55]. It has been demonstrated that strains lacking *SodA* and *SodM* genes are more sensitive to the oxidative stress [52,53]. The deletion of *SodA* and *SodM* genes led to a decrease in bacterial survival, demonstrating that these two SODs are of importance for pathogenicity of *S. aureus* [52,55]. The single deletion of *SodA* also induced a decrease in resistance to the oxidative stress in *Streptococcus pneumoniae*. *Streptococcus pneumoniae* SodA thus appears important for the survival in oxidative stress, and participates in virulence and particularly in the establishment of a pulmonary infection [56–58]. Also in favor of the tricky importance of SODs in bacterial virulence is the finding that staphylococci devoided of coagulase and recognized as avirulent, did not display SodM activity [59].

Catalases also seem to be of interest for ROS detoxification and virulence in bacteria, but to a lesser extent. Only one catalase (kat A) was found in *S. aureus* and its activity increased upon phagocytosis by macrophages. *Kat A* deletion did not affect the survival of the strain, but decreased the nasal colonization drastically compared to the wild type strain. Thus, kat A seems to be important for the colonization process but not essential. That could be explained by the occurrence of compensatory systems; nevertheless an increase in catalase activity was correlated with increased mortality in a mouse model of systemic infection [51,52]. In *Escherichia coli,* both catalases katE and katG are able to detoxify the hydrogen peroxide [60,61], but their implication in virulence is not clear due to the existence of compensatory mechanisms [60].

In *Streptococcus* spp., no catalases were found, so the degradation of hydrogen peroxide in these species must be due to other enzymes of the thioredoxin system. The thiol peroxidase of *S. pneumoniae,* named TpxD, is induced in response to oxidative stress conditions. TpxD is involved in bacterial survival as well as in intranasal infection [56,62]. Deletion of the gene encoding the thioredoxin-like protein tlpA (Etrx1) in *S. pneumoniae* resulted in an increased sensitivity to hydrogen peroxide [63]. Another thioredoxin was identified in *S. pneumoniae*, Etrx2 [64]. The single mutation of *Etrx1* and *Etrx2* decreased the mortality in infected mice compared to the wild type strain, but it seems that a compensatory mechanism occurs [65]. The growth of single mutants for thioredoxins was not affected neither *in vitro* nor *in vivo* in blood and spleen infection models while the deletion of both thioredoxin genes decreased the bacterial growth in a brain infection model [65]. Furthermore, the peroxiredoxin AhpD of *S. pneumoniae* contributes to virulence in pneumonia and bacteremia models, as well as in nasal colonization [56,66]. The peroxiredoxin AhpC found in *S. aureus,* a homologue of AhpD of *S. pneumoniae*, is involved in its resistance against external oxidative stress and is crucial for its survival, persistence and nasal colonization [51,67]. In *E. coli,* AhpC is able to detoxify the hydrogen peroxide but its implication in virulence is not proven [60,61,68]. *Staphylococcus aureus* does not possess enzymes of the glutathione system, but it displays genes encoding a thioredoxin and a thioredoxin reductase that are


A
H_2O_2 or ROOH
GPx-Se
2 GSH^{red}
$NAD(P)H,H^+$
GR
GPx-SeOH
GPx-Se-SG
$GSSG^{ox}$
$NAD(P)^+$
GSH
H_2O
Grx^{ox}
Grx^{red}
H_2O or ROH
$R-(SH)_2$
$R-S_2$
B
H_2O_2 or ROOH
$Prx-(SH)_2$
Trx^{red}
$TrxR^{red}$
$NADPH, H^+$
Prx-SOH(SH)
Prx-SS
Trx^{ox}
$TrxR^{ox}$
$NADP^+$
H_2O
H_2O or ROH
C
H_2O_2 or ROOH
2 ferrocytochromes + 2 H^+
CCP
2 ferricytochromes
2 H_2O or ROH + H_2O
D
H_2O_2 or ROOH
RH + Cl^-
CPO
$R-Cl^-$
2 H_2O or ROH + H_2O

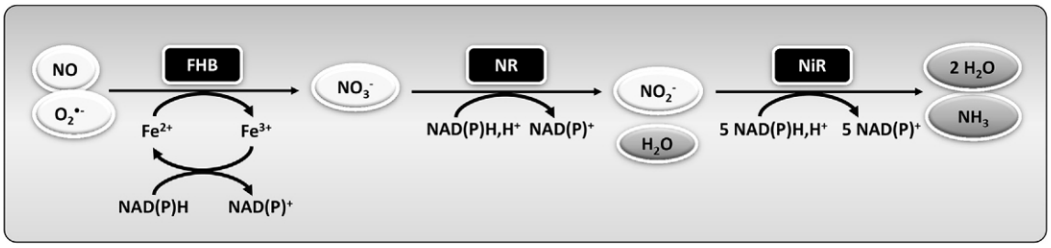


Fig. 3. Degradation mechanism of nitric oxide.
FHB: Flavohemoglobin; NR: Nitrate reductase; NiR: Nitrite reductase.
NH_3: ammonium; NO: nitric oxide; NO_2^-: nitrite; NO_3^-: nitrate; $O_2^{\bullet-}$: superoxide anion.

induced in the presence of chemical oxidants [69]. Moreover, the gene *trxB* encoding a thioredoxin is essential for bacterial growth [69]. In *E. coli,* two thioredoxins, trxA and trxB, are involved in resistance to hydrogen peroxide during both the exponential and stationary phases or only during the stationary phase, respectively. Moreover two thioredoxin reductases (tpx and bcp) play a role in resistance to chemical oxidative stresses [68].

A series of previous works also provides evidence for the involvement of enzymes of the glutathione system in bacterial virulence. In *E. coli,* a glutathione reductase (gor) is implicated in the response to chemical oxidative stresses and a glutaredoxin grxA is induced in presence of hydrogen peroxide [68]. In *Streptococcus pyogenes,* one glutathione peroxidase is essential for survival in the presence of paraquat [70] and contributes to virulence in subcutaneous and systemic infection models [71]. Moreover, the deletion of the glutathione reductase gene in *S. pneumoniae* led to an increased sensitivity to superoxide and to a decrease in the colonization and invasion capacities in mouse models [72].

5.2. Fungal enzymatic antioxidants

Conversely to bacteria, the role of the enzymatic antioxidant systems in virulence of fungi has not been clearly established. SODs also display an important role in detoxification of ROS produced by the host in response to fungi and thereafter in fungal virulence. In *Candida albicans*, as SOD1 and SOD5 protect the yeast and hyphal cells against oxidative stresses generated by macrophages, they are considered as virulent factors [33,73–75]. In *Cryptococcus neoformans*, only two SODs have been identified, a Cu/Zn-SOD (sod1) and a Mn-SOD (sod2), and they were implicated in virulence [76,77]. However, in the prominent filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*, two SODs (AfSOD1p and AfSOD3p) show immunogenic capacity [78–83], but none of them were shown to be a virulence factor.

In *C. albicans,* while identified catalases participate in the detoxification of hydrogen peroxide and in resistance to human leucocytes [84,85], it was not proven that they may act as virulence factors. Moreover, three catalases have been identified in *A. fumigatus*. However, although they are all involved in the degradation of hydrogen peroxide, CatA was not found to be involved in virulence [86–88]. Likewise, four catalases have been identified in *C. neoformans*, but none of them participates to resistance to the oxidative stress and to virulence in a mouse model [89].

Recent advances suggest that glutathione systems could also play an important role in fungal virulence. In *C. albicans*, the glutathione peroxidase GPX31 participates in resistance against killing by macrophages while GPX32 and GPX33 are involved in resistance to neutrophils attack [90]. Also in *C. albicans*, the glutathione reductase (GLR1) was shown to be involved in the oxidative stress response and the S-nitrosoglutathione reductase (GSNOR or Fdh3) in the nitrosative one [91]. Both enzymes were implicated in the defense against killing by macrophages, and play a role in virulence in the *Galleria mellonella* model [91]. The glutaredoxin GRX 2 participates in the defense to chemical oxidative stress [33,92] and macrophages, and was shown to be associated with virulence in a murine model of systemic infection [92]. In *C. neoformans,* the glutathione peroxidase GPX1 and GPX2 are implicated in the chemical oxidative stress response and in protection against ROS, but they were demonstrated to be dispensable for virulence [93]. Finally, other systems of ROS degradation including sod1, sod2, TSA1, CCP, GLR1 and FHB1 appear more important in virulence of *C. neoformans* [93]. For example, the glutathione reductase GLR1 participates to the defense against nitric oxide and is essential for virulence in mice [94].

The thioredoxin system seems to play also a major role in fungal virulence. In *C. albicans*, the peroxiredoxin (PRX1) is implicated in resistance to chemical oxidative stress [95]. PRX1 acts as an antioxidant, and plays a key role in the oxidative stress response [96]; this protein was found essential for virulence of the yeast [96,97]. Thioredoxin reductase TRR1 is able to degrade ROS/RNS generated by neutrophils and is involved in resistance observed in *C. albicans* isolates from recurrent vaginal candidiasis [98–100]. The *C. albicans* TRR1 was thus proposed as a potential antigen for future development of vaccine against candidiasis [98]. *TRR* of *C. neoformans* is an essential gene for vegetative growth and its expression was shown to be inducible when fungal cell were co-cultured with macrophages [101–103]. In *C. neoformans,* the thiol peroxidases TSA1 and TSA3 are overexpressed in the presence of hydrogen peroxide and TSA1 is a virulence factor [104]. The thioredoxin TRX1 is expressed during infection, and TRX1 and TRX2 are important for the oxidative and nitrosative stress defense since their expression is induced under these stress conditions, but TRX1 was shown dispensable for fungal virulence [105,106]. In

Fig. 2. Degradation mechanism of hydrogen peroxide and hydroperoxide radical by the glutaredoxin system (A), the thioredoxin system (B), the cytochrome C peroxidase (C) and the chloride peroxidase (D).
CCP: Cytochrome C peroxidase; CPO: Chloride peroxidase; GPx: Glutathione peroxidase; GPx-Se: Reduced glutathione peroxidase; GPx-SeOH: Oxidized glutathione reductase with selenic acid formation; GPx-Se-SG: Oxidized glutathione peroxidase with glutathione; Grx: Glutaredoxin; Grx^{ox}: Oxidized glutaredoxin; Grx^{red}: Reduced glutaredoxin; GR: Glutathione reductase; GSH: Glutathione; GSH^{red}: Reduced glutathione; $GSSG^{ox}$: Oxidized glutathione; Prx: Peroxiredoxin; Prx-$(SH)_2$: Reduced peroxiredoxin; Prx-SOH(SH): Partially oxidized peroxiredoxin; Prx-SS: oxidized peroxiredoxin; Trx^{ox}: Oxidized thioredoxin; Trx^{red}: Reduced thioredoxin; $TrxR^{ox}$: Oxidized thioredoxin reductase;
Cl^-: chloride; H_2O_2: Hydrogen peroxide; ROOH: Hydroperoxide radical; ROH: Alcohol; R-SH_2: Reduced protein; R-S_2: Oxidized protein.

A. fumigatus, the Asp f 3 allergen has been identified as a putative thioredoxin peroxidase [107] and as an immunogenic marker of the allergic broncho-pulmonary aspergillosis (ABPA) [108,109]. This protein was shown to be strongly induced by hydrogen peroxide [107]. The thioredoxins of *A. fumigatus* are required for survival of hyphae exposed to an oxidative stress induced by neutrophils and are required for fungal growth during corneal infection [107,110]. Moreover, the thioredoxin reductase GliT is overexpressed in response to oxidative stress induced by phagocytic cells and particularly by neutrophils [111].

Other peroxidases were also associated with virulence, in particular the cytochrome C peroxidase from *C. neoformans* that participates *in vitro* in the response to oxidative stress allowing survival in macrophages, and was demonstrated to play a role in virulence of this fungus [112,113]. Likewise, the chloroperoxidase participates in the oxidative stress response in *Aspergillus flavus, Caldariomyces fumago* (now called *Leptoxyphium fumago*), *Sinirhizobium meliloti*, and *Streptomyces coelicolor* [42,43,114,115].

Fungi also possess enzymes protecting them against nitrosative stress. *Candida albicans* harbors a flavohemoglobin (CaYHB1) which is induced exclusively in response to nitrosative stress [116] or in the presence of macrophages, and which participates to virulence [117]. Another flavohemoglobin (FHB1) found in C. *neoformans* mediates resistance against nitrosative stress as well as virulence in a murine inhalation model [118]. Finally, in *A. oryzae*, flavohemoglobins were also shown to play an important role in RNS detoxification [119].

5.3. Parasite enzymatic antioxidants

As bacteria, molds and yeasts, parasites also possessed genes implicated in the defense against the oxidative burst response of phagocytic cells. In *Entamoeba histolytica,* some antioxidant enzymes are lacking in the genome as catalases, peroxidases, and enzymes of glutathione system [120]. However, during the host tissue invasion, trophozoites must defend themselves against the oxidative stress and several enzymes were shown to be implicated in the adaptation process including peroxiredoxin, superoxide dismutase, flavoprotein A, thioredoxin and thioredoxin reductase [120–123]. This antioxidant defense is associated with pathogenicity of the parasite and the thioredoxin system is crucial for its survival [120]. In *Trypanosoma cruzi,* four Fe-SOD isoforms participate in resistance of the parasite [124,125] and are used for serodiagnosis in dogs [126]. Fe-SOD plays a crucial role in pathogenesis [127]. Moreover, the cytoplasmic tryparedoxin peroxidase (TcCPX) confers resistance to killing by macrophages [127], the glutathione peroxidases (TcGPXI and TcGPXII) are implicated in resistance to chemical oxidative stress [128,129] and the cytoplasmic tryparedoxin peroxidase as well as the mitochondrial peroxidase (TcMPX) are essential for ROS detoxification and virulence [130–133]. In *Plasmodium malariae*, several enzymes participate in the protection against ROS and particularly those of the glutathione and thioredoxin systems and SOD [134,135], and TrxR is essential in erythrocytic stages [136,137].

6. Conclusion

To colonize their host and generate an infection, microbial pathogens must escape the oxidative and nitrosative burst response of phagocytic cells. To maintain ROS and RNS at sub-lethal concentrations, microbial pathogens display various antioxidant mechanisms and among them, superoxide dismutases, catalases, enzymes of the glutathione or thioredoxin systems, as well as other peroxidases, flavohemoglobins and nitrate or nitrite reductases were identified as protection factors. The importance of these enzymes for ROS and RNS detoxification is now well established and some of them are considered as virulence factors as they play key roles in bacteria, fungi or parasites.

Depending on the organism, some of these enzymes seem to be dispensable whereas others act as key virulence factors. In consequence, these enzymes progressively emerge as interesting targets for biological diagnosis as well as for pharmaceutical development.

References

[1] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M.T.D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease, Int. J. Biochem. Cell Biol. 39 (2007) 44–84, http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2006.07.001.

[2] T.A. Belozerskaya, N.N. Gessler, Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: a review, Appl. Biochem. Microbiol. 43 (2007) 506–515, http://dx.doi.org/10.1134/S0003683807050031.

[3] H. Sies, Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine, Redox Biol. 4 (2015) 180–183, http://dx.doi.org/10.1016/j.redox.2015.01.002.

[4] F.C. Fang, Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies, Nat. Rev. Microbiol. 2 (2004) 820–832, http://dx.doi.org/10.1038/nrmicro1004.

[5] C. Nathan, M.U. Shiloh, Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 (2000) 8841–8848.

[6] K.J.A. Davies, Oxidative stress: the paradox of aerobic life, Biochem. Soc. Symp. 61 (1995) 1–31, http://dx.doi.org/10.1042/bss0610001.

[7] E. Cadenas, K.J.A. Davies, Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging, Free Radic. Biol. Med. 29 (2000) 222–230, http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(00)00317-8.

[8] W. Dröge, Free radicals in the physiological control of cell function, Physiol. Rev. 82 (2002) 47–95, http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00018.2001.

[9] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer, Chem. Biol. Interact. 160 (2006) 1–40, http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2005.12.009.

[10] J. Delattre, J.-L. Beaudeux, D. Bonnefont-Rousselot, Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques, Lavoisier (2007) 1–108.

[11] K. Bedard, K.-H. Krause, The NOX family of ROS-generating NADPH oxidases: physiology and pathophysiology, Physiol. Rev. 87 (2007) 245–313, http://dx.doi.org/10.1152/physrev.00044.2005.

[12] B. Griffith, S. Pendyala, L. Hecker, P.J. Lee, V. Natarajan, V.J. Thannickal, NOX enzymes and pulmonary disease, Antioxid. Redox Signal 11 (2009) 2505–2516, http://dx.doi.org/10.1089/ARS.2009.2599.

[13] N. Grandvaux, A. Soucy-Faulkner, K. Fink, Innate host defense: Nox and Duox on phox's tail, Biochimie 89 (2007) 1113–1122, http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2007.04.008.

[14] C. Guichard, E. Pedruzzi, M. Fay, S. Ben Mkaddem, N. Coant, F. Daniel, E. Ogier-Denis, The Nox/Duox family of ROS-generating NADPH oxidases, Med. Sci. 22 (2006) 953–959, http://dx.doi.org/10.1051/medsci/20062211953.

[15] B. Rada, C. Hably, A. Meczner, C. Timár, G. Lakatos, P. Enyedi, E. Ligeti, Role of Nox2 in elimination of microorganisms, Semin. Immunopathol. 30 (2008) 237–253, http://dx.doi.org/10.1007/s00281-008-0126-3.

[16] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, second ed., 1989. OUP Oxford.

[17] B. Halliwell, J.M.C. Gutteridge, Free Radicals in Biology and Medicine, fifth ed., 2015. OUP Oxford.

[18] C.E. Cooper, Nitric oxide and iron proteins, Biochim. Biophys. Acta 1411 (1999) 290–309, http://dx.doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00021-3.

[19] B.M. Babior, The respiratory burst of phagocytes, J. Clin. Invest 73 (1984) 599–601, http://dx.doi.org/10.1172/JCI111249.

[20] E.L. Campbell, S.P. Colgan, Neutrophils and inflammatory metabolism in antimicrobial functions of the mucosa, J. Leukoc. Biol. 98 (2015) 517–522, http://dx.doi.org/10.1189/jlb.3MR1114-556R.

[21] A. da S. Dantas, A. Day, M. Ikeh, I. Kos, B. Achan, J. Quinn, Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*, Biomolecules 5 (2015) 142–165, http://dx.doi.org/10.3390/biom5010142.

[22] S.M. Holland, Chronic granulomatous disease, Clin. Rev. Allergy Immunol. 38 (2010) 3–10, http://dx.doi.org/10.1007/s12016-009-8136-z.

[23] E.L. Falcone, S.M. Holland, Streptococcal infections in patients with chronic granulomatous disease: case report and review of the literature, J. Clin. Immunol. 33 (2013) 310, http://dx.doi.org/10.1007/s10875-012-9823-8.

[24] B.E. Marciano, C. Spalding, A. Fitzgerald, D. Mann, T. Brown, S. Osgood, L. Yockey, D.N. Darnell, L. Barnhart, J. Daub, L. Boris, A.P. Rump, V.L. Anderson, C. Haney, D.B. Kuhns, S.D. Rosenzweig, C. Kelly, A. Zelazny, T. Mason, S.S. DeRavin, E. Kang, J.I. Gallin, H.L. Malech, K.N. Olivier, G. Uzel, A.F. Freeman, T. Heller, C.S. Zerbe, S.M. Holland, Common severe infections in chronic granulomatous disease, Clin. Infect. Dis. 60 (2015) 1176–1183, http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciu1154.

[25] S. Henriet, P.E. Verweij, S.M. Holland, A. Warris, Invasive fungal infections in patients with chronic granulomatous disease, Adv. Exp. Med. Biol. 764 (2013) 27–55.

[26] N.M. Iovine, S. Pursnani, A. Voldman, G. Wasserman, M.J. Blaser, Y. Weinrauch, Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*, Infect. Immun. 76 (2008) 986–993, http://dx.doi.org/10.1128/IAI.01063-07.

[27] A.V. Allain, V.T. Hoang, G.F. Lasker, E.A. Pankey, S.N. Murthy, P.J. Kadowitz, Role of nitric oxide in developmental biology in plants, bacteria, and man, Curr. Top. Pharmacol. 15 (2011) 25–33.

[28] A.J.P. Brown, S. Budge, D. Kaloriti, A. Tillmann, M.D. Jacobsen, Z. Yin, I.V. Ene, I. Bohovych, D. Sandai, S. Kastora, J. Potrykus, E.R. Ballou, D.S. Childers, S. Shahana, M.D. Leach, Stress adaptation in a pathogenic fungus, J. Exp. Biol. 217 (2014) 144–155, http://dx.doi.org/10.1242/jeb.088930.

[29] I. Fridovich, Superoxide radical and superoxide dismutases, Annu. Rev. Biochem. (1995) 97–112.

[30] P. Miramón, C. Dunker, H. Windecker, I.M. Bohovych, A.J.P. Brown, O. Kurzai, B. Hube, Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress, PLoS ONE 7 (2012), http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0052850.

[31] D.A. Dickinson, H.J. Forman, Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol, Ann. N. Y. Acad. Sci. 973 (2002) 488–504.

[32] C.M. Grant, F.H. Maciver, I.W. Dawes, Stationary-phase induction of GLR1 expression is mediated by the yAP-1 transcriptional regulatory protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, Mol. Microbiol. 22 (1996) 739–746.

[33] G.M. Chaves, W.P. da Silva, Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione and diamide, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 107 (2012) 998–1005, http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000800006.

[34] E. Herrero, J. Ros, G. Bellí, E. Cabiscol, Redox control and oxidative stress in yeast cells, Biochim. Biophys. Acta 1780 (2008) 1217–1235, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2007.12.004.

[35] A. Hall, K. Nelson, L.B. Poole, P.A. Karplus, Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins, Antioxid. Redox Signal 15 (2011) 795–815, http://dx.doi.org/10.1089/ars.2010.3624.

[36] Z.A. Wood, E. Schröder, J. Robin Harris, L.B. Poole, Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, Trends Biochem. Sci. 28 (2003) 32–40.

[37] J. Lu, A. Holmgren, The thioredoxin antioxidant system, Free Radic. Biol. Med. 66 (2014) 75–87, http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2013.07.036.

[38] E.S. Arnér, A. Holmgren, Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase, Eur. J. Biochem. 267 (2000) 6102–6109.

[39] J.E. Erman, L.B. Vitello, Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering, Biochim. Biophys. Acta 1597 (2002) 193–220.

[40] A.S. Dantas, R.V. Andrade, M.J. de Carvalho, M.S.S. Felipe, E.G. Campos, Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome c peroxidase, Mycol. Res. 112 (2008) 747–756, http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2007.11.018.

[41] F. van Rantwijk, R.A. Sheldon, Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects, Curr. Opin. Biotechnol. 11 (2000) 554–564.

[42] T.J. Jacks, A.J. De Lucca, N.M. Morris, Effects of chloroperoxidase and hydrogen peroxide on the viabilities of *Aspergillus flavus* conidiospores, Mol. Cell Biochem. 195 (1999) 169–172.

[43] M. Buchhaupt, K. Ehrich, S. Hüttmann, J. Guder, J. Schrader, Over-expression of chloroperoxidase in *Caldariomyces fumago*, Biotechnol. Lett. 33 (2011) 2225–2231, http://dx.doi.org/10.1007/s10529-011-0683-8.

[44] M.T. Forrester, C.E. Eyler, J.N. Rich, Bacterial flavohemoglobin: a molecular tool to probe mammalian nitric oxide biology, BioTechniques 50 (2011) 41–45, http://dx.doi.org/10.2144/000113586.

[45] L. Liu, M. Zeng, A. Hausladen, J. Heitman, J.S. Stamler, Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 97 (2000) 4672–4676, http://dx.doi.org/10.1073/pnas.090083597.

[46] M.T. Forrester, M.W. Foster, Protection from nitrosative stress: a central role for microbial flavohemoglobin, Free Radic. Biol. Med. 52 (2012) 1620–1633, http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.01.028.

[47] R. Hardison, Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression, J. Exp. Biol. 201 (1998) 1099–1117.

[48] W.H. Campbell, K.R. Kinghorn, Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases, Trends Biochem. Sci. 15 (1990) 315–319.

[49] J.M. Siverio, Assimilation of nitrate by yeasts, FEMS Microbiol. Rev. 26 (2002) 277–284, http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00615.x.

[50] D.R. Crawford, K.J. Davies, Adaptive response and oxidative stress, Environ. Health Perspect. 102 (Suppl 10) (1994) 25–28.

[51] R. Gaupp, N. Ledala, G.A. Somerville, Staphylococcal response to oxidative stress, Front. Cell Infect. Microbiol. 2 (2012) 33, http://dx.doi.org/10.3389/fcimb.2012.00033.

[52] W.N. Beavers, E.P. Skaar, Neutrophil-generated oxidative stress and protein damage in *Staphylococcus aureus*, Pathog. Dis. 74 (2016), http://dx.doi.org/10.1093/femspd/ftw060.

[53] M.O. Clements, S.P. Watson, S.J. Foster, Characterization of the major superoxide dismutase of *Staphylococcus aureus* and its role in starvation survival, stress resistance, and pathogenicity, J. Bacteriol. 181 (1999) 3898–3903.

[54] D. Das, S.S. Saha, B. Bishayi, Intracellular survival of *Staphylococcus aureus*: correlating production of catalase and superoxide dismutase with levels of inflammatory cytokines, Inflamm. Res. 57 (2008) 340–349, http://dx.doi.org/10.1007/s00011-007-7206-z.

[55] D. Das, B. Bishayi, Contribution of catalase and superoxide dismutase to the intracellular survival of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* in murine macrophages, Indian J. Microbiol. 50 (2010) 375–384, http://dx.doi.org/10.1007/s12088-011-0063-z.

[56] H. Yesilkaya, V.F. Andisi, P.W. Andrew, J.J.E. Bijlsma, *Streptococcus pneumoniae* and reactive oxygen species: an unusual approach to living with radicals, Trends Microbiol. 21 (2013) 187–195, http://dx.doi.org/10.1016/j.tim.2013.01.004.

[57] D. Gerlach, W. Reichardt, S. Vettermann, Extracellular superoxide dismutase from *Streptococcus pyogenes* type 12 strain is manganese-dependent, FEMS Microbiol. Lett. 160 (1998) 217–224.

[58] D.J. McMillan, M.R. Davies, M.F. Good, K.S. Sriprakash, Immune response to superoxide dismutase in group A streptococcal infection, FEMS Immunol. Med. Microbiol. 40 (2004) 249–256, http://dx.doi.org/10.1016/S0928-8244(04)00003-3.

[59] M.W. Valderas, J.W. Gatson, N. Wreyford, M.E. Hart, The superoxide dismutase gene sodM is unique to *Staphylococcus aureus*: absence of sodM in coagulase-negative staphylococci, J. Bacteriol. 184 (2002) 2465–2472, http://dx.doi.org/10.1128/JB.184.9.2465-2472.2002.

[60] L.C. Seaver, J.A. Imlay, Alkyl hydroperoxide reductase is the primary scavenger of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. 183 (2001) 7173–7181, http://dx.doi.org/10.1128/JB.183.24.7173-7181.2001.

[61] S. Park, X. You, J.A. Imlay, Substantial DNA damage from submicromolar intracellular hydrogen peroxide detected in Hpx- mutants of *Escherichia coli*, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 102 (2005) 9317–9322, http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0502051102.

[62] B. Hajaj, H. Yesilkaya, R. Benisty, M. David, P.W. Andrew, N. Porat, Thiol peroxidase is an important component of *Streptococcus pneumoniae* in oxygenated environments, Infect. Immun. 80 (2012) 4333–4343, http://dx.doi.org/10.1128/IAI.00126-12.

[63] V. Farshchi Andisi, C.A. Hinojosa, A. de Jong, O.P. Kuipers, C.J. Orihuela, J.J.E. Bijlsma, Pneumococcal gene complex involved in resistance to extracellular oxidative stress, Infect. Immun. 80 (2012) 1037–1049, http://dx.doi.org/10.1128/IAI.05563-11.

[64] M. Saleh, S.G. Bartual, M.R. Abdullah, I. Jensch, T.M. Asmat, L. Petruschka, T. Pribyl, M. Gellert, C.H. Lillig, H. Antelmann, J.A. Hermoso, S. Hammerschmidt, Molecular architecture of *Streptococcus pneumoniae* surface thioredoxin-fold lipoproteins crucial for extracellular oxidative stress resistance and maintenance of virulence, EMBO Mol. Med. 5 (2013) 1852–1870, http://dx.doi.org/10.1002/emmm.201202435.

[65] S. Ribes, M.R. Abdullah, M. Saleh, U.-K. Hanisch, R. Nau, S. Hammerschmidt, Thioredoxins and methionine sulfoxide reductases in the pathophysiology of pneumococcal meningitis, J. Infect. Dis. 214 (2016) 953–961, http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jiw268.

[66] G.K. Paterson, C.E. Blue, T.J. Mitchell, An operon in *Streptococcus pneumoniae* containing a putative alkylhydroperoxidase D homologue contributes to virulence and the response to oxidative stress, Microb. Pathog. 40 (2006) 152–160, http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2005.12.003.

[67] K. Cosgrove, G. Coutts, I.-M. Jonsson, A. Tarkowski, J.F. Kokai-Kun, J.J. Mond, S.J. Foster, Catalase (KatA) and alkyl hydroperoxide reductase (AhpC) have compensatory roles in peroxide stress resistance and are required for survival, persistence, and nasal colonization in *Staphylococcus aureus*, J. Bacteriol. 189 (2007) 1025–1035, http://dx.doi.org/10.1128/JB.01524-06.

[68] O. Carmel-Harel, G. Storz, Roles of the glutathione- and thioredoxin-dependent reduction systems in the *Escherichia coli* and *Saccharomyces cerevisiae* responses to oxidative stress, Annu. Rev. Microbiol. 54 (2000) 439–461, http://dx.doi.org/10.1146/annurev.micro.54.1.439.

[69] O. Uziel, I. Borovok, R. Schreiber, G. Cohen, Y. Aharonowitz, Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress, J. Bacteriol. 186 (2004) 326–334.

[70] K.Y. King, J.A. Horenstein, M.G. Caparon, Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*, J. Bacteriol. 182 (2000) 5290–5299.

[71] A. Brenot, K.Y. King, B. Janowiak, O. Griffith, M.G. Caparon, Contribution of glutathione peroxidase to the virulence of *Streptococcus pyogenes*, Infect. Immun. 72 (2004) 408–413.

[72] A.J. Potter, C. Trappetti, J.C. Paton, *Streptococcus pneumoniae* uses glutathione to defend against oxidative stress and metal ion toxicity, J. Bacteriol. 194 (2012) 6248–6254, http://dx.doi.org/10.1128/JB.01393-12.

[73] C. Fradin, P. De Groot, D. MacCallum, M. Schaller, F. Klis, F.C. Odds, B. Hube, Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood, Mol. Microbiol. 56 (2005) 397–415, http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04557.x.

[74] C.-S. Hwang, G. Rhie, J.-H. Oh, W.-K. Huh, H.-S. Yim, S.-O. Kang, Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence, Microbiology 148 (2002) 3705–3713.

[75] C. Lamarre, J. LeMay, N. Deslauriers, Y. Bourbonnais, *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase, J. Biol. Chem. 276 (2001) 43784–43791.

[76] G.M. Cox, T.S. Harrison, H.C. McDade, C.P. Taborda, G. Heinrich, A. Casadevall, J.R. Perfect, Superoxide dismutase influences the virulence of *Cryptococcus*

neoformans by affecting growth within macrophages, Infect. Immun. 71 (2003) 173–180.
[77] S.D. Narasipura, V. Chaturvedi, S. Chaturvedi, Characterization of *Cryptococcus neoformans variety gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence, Mol. Microbiol. 55 (2005) 1782–1800, http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04503.x.
[78] K. Lambou, C. Lamarre, R. Beau, N. Dufour, J.-P. Latge, Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*, Mol. Microbiol. 75 (2010) 910–923, http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.07024.x.
[79] J. Sarfati, M. Monod, P. Recco, A. Sulahian, C. Pinel, E. Candolfi, T. Fontaine, J.-P. Debeaupuis, M. Tabouret, J.-P. Latgé, Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis, Diagn Microbiol. Infect. Dis. 55 (2006) 279–291, http://dx.doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.02.002.
[80] A.J. Hamilton, M.D. Holdom, R.J. Hay, Specific recognition of purified Cu,Zn superoxide dismutase from *Aspergillus fumigatus* by immune human sera, J. Clin. Microbiol. 33 (1995) 495–496.
[81] M.D. Holdom, B. Lechenne, R.J. Hay, A.J. Hamilton, M. Monod, Production and characterization of recombinant *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera, J. Clin. Microbiol. 38 (2000) 558–562.
[82] R. Crameri, A. Faith, S. Hemmann, R. Jaussi, C. Ismail, G. Menz, K. Blaser, Humoral and cell-mediated autoimmunity in allergy to *Aspergillus fumigatus*, J. Exp. Med. 184 (1996) 265–270.
[83] M. Schwienbacher, L. Israel, J. Heesemann, F. Ebel, Asp f6, an *Aspergillus* allergen specifically recognized by IgE from patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis, is differentially expressed during germination, Allergy 60 (2005) 1430–1435, http://dx.doi.org/10.1111/j.1398-9995.2005.00904.x.
[84] D.R. Wysong, L. Christin, A.M. Sugar, P.W. Robbins, R.D. Diamond, Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene, Infect. Immun. 66 (1998) 1953–1961.
[85] C. Komalapriya, D. Kaloriti, A.T. Tillmann, Z. Yin, C. Herrero-de-Dios, M.D. Jacobsen, R.C. Belmonte, G. Cameron, K. Haynes, C. Grebogi, A.P.S. de Moura, N.A.R. Gow, M. Thiel, J. Quinn, A.J.P. Brown, M.C. Romano, Integrative model of oxidative stress adaptation in the fungal pathogen *Candida albicans*, PLoS ONE 10 (2015), http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0137750.
[86] K. Shibuya, S. Paris, T. Ando, H. Nakayama, T. Hatori, J.-P. Latgé, Catalases of *Aspergillus fumigatus* and inflammation in aspergillosis, Nihon Ishinkin Gakkai Zasshi 47 (2006) 249–255.
[87] S. Paris, D. Wysong, J.-P. Debeaupuis, K. Shibuya, B. Philippe, R.D. Diamond, J.-P. Latgé, Catalases of *Aspergillus fumigatus*, Infect. Immun. 71 (2003) 3551–3562, http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.6.3551-3562.2003.
[88] B. Philippe, O. Ibrahim-Granet, M.C. Prevost, M.A. Gougerot-Pocidalo, M. Sanchez Perez, A. Van der Meeren, J.P. Latge, Killing of *Aspergillus fumigatus* by alveolar macrophages is mediated by reactive oxidant intermediates, Infect. Immun. 71 (2003) 3034–3042, http://dx.doi.org/10.1128/IAI.71.6.3034-3042.2003.
[89] S.S. Giles, J.E. Stajich, C. Nichols, Q.D. Gerrald, J.A. Alspaugh, F. Dietrich, J.R. Perfect, The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense, Eukaryot. Cell. 5 (2006) 1447–1459, http://dx.doi.org/10.1128/EC.00098-06.
[90] P. Miramón, C. Dunker, L. Kasper, I.D. Jacobsen, D. Barz, O. Kurzai, B. Hube, A family of glutathione peroxidases contributes to oxidative stress resistance in *Candida albicans*, Med. Mycol. 52 (2014) 223–239, http://dx.doi.org/10.1093/mmy/myt021.
[91] A.T. Tillmann, K. Strijbis, G. Cameron, E. Radmaneshfar, M. Thiel, C.A. Munro, D.M. MacCallum, B. Distel, N.A.R. Gow, A.J.P. Brown, Contribution of Fdh3 and Glr1 to glutathione redox state, stress adaptation and virulence in *Candida albicans*, PLoS ONE 10 (2015) e0126940, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0126940.
[92] G.M. Chaves, S. Bates, D.M. Maccallum, F.C. Odds, *Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model, Genet. Mol. Res. 6 (2007) 1051–1063.
[93] T.A. Missall, J.F. Cherry-Harris, J.K. Lodge, Two glutathione peroxidases in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans* are expressed in the presence of specific substrates, Microbiology 151 (2005) 2573–2581, http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.28132-0.
[94] T.A. Missall, M.E. Pusateri, M.J. Donlin, K.T. Chambers, J.A. Corbett, J.K. Lodge, Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence, Eukaryot. Cell. 5 (2006) 518–529, http://dx.doi.org/10.1128/EC.5.3.518-529.2006.
[95] K. Srinivasa, N.-R. Kim, J. Kim, M. Kim, J.Y. Bae, W. Jeong, W. Kim, W. Choi, Characterization of a putative thioredoxin peroxidase Prx1 of *Candida albicans*, Mol. Cells 33 (2012) 301–307, http://dx.doi.org/10.1007/s10059-012-2260-y.
[96] A. da Silva Dantas, M.J. Patterson, D.A. Smith, D.M. Maccallum, L.P. Erwig, B.A. Morgan, J. Quinn, Thioredoxin regulates multiple hydrogen peroxide-induced signaling pathways in *Candida albicans*, Mol. Cell Biol. 30 (2010) 4550–4563, http://dx.doi.org/10.1128/MCB.00313-10.
[97] C. Fradin, M. Kretschmar, T. Nichterlein, C. Gaillardin, C. d Enfert, B. Hube, Stage-specific gene expression of *Candida albicans* in human blood, Mol. Microbiol. 47 (2003) 1523–1543.
[98] J.S.R. Godoy, É.S. Kioshima, A.K.R. Abadio, M.S.S. Felipe, S.M. de Freitas, T.I.E. Svidzinski, Structural and functional characterization of the recombinant thioredoxin reductase from *Candida albicans* as a potential target for vaccine and drug design, Appl. Microbiol. Biotechnol. 100 (2015) 4015–4025, http://dx.doi.org/10.1007/s00253-015-7223-8.
[99] H. Kusch, S. Engelmann, D. Albrecht, J. Morschhäuser, M. Hecker, Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*, Proteomics 7 (2007) 686–697, http://dx.doi.org/10.1002/pmic.200600575.
[100] B.A. Ratti, J.S.R. Godoy, P. de Souza Bonfim Mendonça, D.L. Bidóia, T.U. Nakamura, C.V. Nakamura, M.E. Lopes Consolaro, T.I. Estivalet Svidzinski, S. de Oliveira Silva, Microbicidal activity of neutrophils is inhibited by isolates from recurrent vaginal candidiasis (RVVC) caused by *Candida albicans* through fungal thioredoxin reductase, Cell Immunol. 293 (2015) 22–29, http://dx.doi.org/10.1016/j.cellimm.2014.11.004.
[101] T.A. Missall, J.K. Lodge, Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*, Eukaryot. Cell. 4 (2005) 487–489, http://dx.doi.org/10.1128/EC.4.2.487-489.2005.
[102] G. Ianiri, A. Idnurm, Essential gene discovery in the basidiomycete *Cryptococcus neoformans* for antifungal drug target prioritization, mBio 6 (2015), http://dx.doi.org/10.1128/mBio.02334-14 e02334–14.
[103] A.K.R. Abadio, E.S. Kioshima, M.M. Teixeira, N.F. Martins, B. Maigret, M.S.S. Felipe, Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens, BMC Genomics 12 (2011) 75, http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-12-75.
[104] T.A. Missall, M.E. Pusateri, J.K. Lodge, Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*, Mol. Microbiol. 51 (2004) 1447–1458, http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2004.03921.x.
[105] B.R. Steen, S. Zuyderduyn, D.L. Toffaletti, M. Marra, S.J.M. Jones, J.R. Perfect, J. Kronstad, *Cryptococcus neoformans* gene expression during experimental cryptococcal meningitis, Eukaryot. Cell. 2 (2003) 1336–1349.
[106] T.A. Missall, J.K. Lodge, Function of the thioredoxin proteins in *Cryptococcus neoformans* during stress or virulence and regulation by putative transcriptional modulators, Mol. Microbiol. 57 (2005) 847–858, http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04735.x.
[107] F. Lessing, O. Kniemeyer, I. Wozniok, J. Loeffler, O. Kurzai, A. Haertl, A.A. Brakhage, The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator *AfYap1* represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model, Eukaryot. Cell. 6 (2007) 2290–2302, http://dx.doi.org/10.1128/EC.00267-07.
[108] A.R. Asif, M. Oellerich, V.W. Amstrong, B. Riemenschneider, M. Monod, U. Reichard, Proteome of conidial surface associated proteins of *Aspergillus fumigatus* reflecting potential vaccine candidates and allergens, J. Proteome Res. 5 (2006) 954–962, http://dx.doi.org/10.1021/pr0504586.
[109] S. Hemmann, G. Menz, C. Ismail, K. Blaser, R. Crameri, Skin test reactivity to 2 recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in *A. fumigatus*-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization, J. Allergy Clin. Immunol. 104 (1999) 601–607.
[110] S.M. Leal, C. Vareechon, S. Cowden, B.A. Cobb, J.-P. Latgé, M. Momany, E. Pearlman, Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection, J. Clin. Invest 122 (2012) 2482–2498, http://dx.doi.org/10.1172/JCI63239.
[111] J.A. Sugui, H.S. Kim, K.A. Zarember, Y.C. Chang, J.I. Gallin, W.C. Nierman, K.J. Kwon-Chung, Genes differentially expressed in conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon exposure to human neutrophils, PLoS ONE 3 (2008) e2655, http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0002655.
[112] S.S. Giles, J.R. Perfect, G.M. Cox, Cytochrome c peroxidase contributes to the antioxidant defense of *Cryptococcus neoformans*, Fungal Genet. Biol. 42 (2005) 20–29, http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2004.09.003.
[113] R. Upadhya, L.T. Campbell, M.J. Donlin, R. Aurora, J.K. Lodge, Global transcriptome profile of *Cryptococcus neoformans* during exposure to hydrogen peroxide induced oxidative stress, PLoS ONE 8 (2013), http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0055110.
[114] R. De Mot, G. Schoofs, I. Nagy, Proteome analysis of *Streptomyces coelicolor* mutants affected in the proteasome system reveals changes in stress-responsive proteins, Arch. Microbiol. 188 (2007) 257–271, http://dx.doi.org/10.1007/s00203-007-0243-8.
[115] F. Barloy-Hubler, A. Chéron, A. Hellégouarch, F. Galibert, Smc01944, a secreted peroxidase induced by oxidative stresses in *Sinorhizobium meliloti* 1021, Microbiology 150 (2004) 657–664, http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26764-0.
[116] B.D. Ullmann, H. Myers, W. Chiranand, A.L. Lazzell, Q. Zhao, L.A. Vega, J.L. Lopez-Ribot, P.R. Gardner, M.C. Gustin, Inducible defense mechanism against nitric oxide in *Candida albicans*, Eukaryot. Cell. 3 (2004) 715–723, http://dx.doi.org/10.1128/EC.3.3.715-723.2004.
[117] B.S. Hromatka, S.M. Noble, A.D. Johnson, Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the *YHB1* gene in nitrosative stress and virulence, Mol. Biol. Cell. 16 (2005) 4814–4826, http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E05-05-0435.
[118] M. de Jesús-Berríos, L. Liu, J.C. Nussbaum, G.M. Cox, J.S. Stamler, J. Heitman, Enzymes that counteract nitrosative stress promote fungal virulence, Curr. Biol. 13 (2003) 1963–1968, http://dx.doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.029.
[119] S. Zhou, S. Fushinobu, S.-W. Kim, Y. Nakanishi, J. Maruyama, K. Kitamoto, T. Wakagi, H. Shoun, Functional analysis and subcellular location of two flavohemoglobins from *Aspergillus oryzae*, Fungal Genet. Biol. 48 (2011) 200–207, http://dx.doi.org/10.1016/j.fgb.2010.08.011.

[120] K. Nakada-Tsukui, T. Nozaki, Immune response of amebiasis and immune evasion by *Entamoeba histolytica*, Front. Immunol. 7 (2016) 175, http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2016.00175.
[121] J.B. Vicente, G.M. Ehrenkaufer, L.M. Saraiva, M. Teixeira, U. Singh, *Entamoeba histolytica* modulates a complex repertoire of novel genes in response to oxidative and nitrosative stresses: implications for amebic pathogenesis, Cell Microbiol. 11 (2009) 51–69, http://dx.doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01236.x.
[122] D.G. Arias, E.L. Regner, A.A. Iglesias, S.A. Guerrero, *Entamoeba histolytica* thioredoxin reductase: molecular and functional characterization of its atypical properties, Biochim. Biophys. Acta 1820 (2012) 1859–1866, http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagen.2012.08.020.
[123] E. Rastew, J.B. Vicente, U. Singh, Oxidative stress resistance genes contribute to the pathogenic potential of the anaerobic protozoan parasite, *Entamoeba histolytica*, Int. J. Parasitol. 42 (2012) 1007–1015, http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2012.08.006.
[124] H. Mateo, C. Marín, G. Pérez-Cordón, M. Sánchez-Moreno, Purification and biochemical characterization of four iron superoxide dismutases in *Trypanosoma cruzi*, Mem. Inst. Oswaldo Cruz 103 (2008) 271–276.
[125] A. Machado-Silva, P.G. Cerqueira, V. Grazielle-Silva, F.R. Gadelha, E. de F. Peloso, S.M.R. Teixeira, C.R. Machado, How *Trypanosoma cruzi* deals with oxidative stress: antioxidant defence and DNA repair pathways, Mutat. Res. Rev. Mutat. Res. 767 (2016) 8–22, http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2015.12.003.
[126] A. López-Cespedes, S.S. Longoni, C.H. Sauri-Arceo, R.I. Rodríguez-Vivas, N. Villegas, J. Escobedo-Ortegón, M.A. Barrera-Pérez, M. Sánchez-Moreno, M.E. Bolio González, C. Marín, Seroprevalence of antibodies against the excreted antigen superoxide dismutase by *Trypanosoma cruzi* in dogs from the Yucatan Peninsula (Mexico), Zoonoses Public Health 60 (2013) 277–283, http://dx.doi.org/10.1111/j.1863-2378.2012.01520.x.
[127] M.N. Alvarez, G. Peluffo, L. Piacenza, R. Radi, Intraphagosomal peroxynitrite as a macrophage-derived cytotoxin against internalized *Trypanosoma cruzi*: consequences for oxidative killing and role of microbial peroxiredoxins in infectivity, J. Biol. Chem. 286 (2011) 6627–6640, http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M110.167247.
[128] L. Piacenza, G. Peluffo, M.N. Alvarez, A. Martínez, R. Radi, *Trypanosoma cruzi* antioxidant enzymes as virulence factors in Chagas disease, Antioxid. Redox Signal 19 (2013) 723–734, http://dx.doi.org/10.1089/ars.2012.4618.
[129] S.R. Wilkinson, D.J. Meyer, M.C. Taylor, E.V. Bromley, M.A. Miles, J.M. Kelly, The *Trypanosoma cruzi* enzyme TcGPXI is a glycosomal peroxidase and can be linked to trypanothione reduction by glutathione or tryparedoxin, J. Biol. Chem. 277 (2002) 17062–17071, http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M111126200.
[130] L. Piacenza, G. Peluffo, M.N. Alvarez, J.M. Kelly, S.R. Wilkinson, R. Radi, Peroxiredoxins play a major role in protecting *Trypanosoma cruzi* against macrophage- and endogenously-derived peroxynitrite, Biochem. J. 410 (2008) 359–368, http://dx.doi.org/10.1042/BJ20071138.
[131] M. Trujillo, H. Budde, M.D. Piñeyro, M. Stehr, C. Robello, L. Flohé, R. Radi, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi* tryparedoxin peroxidases catalytically detoxify peroxynitrite via oxidation of fast reacting thiols, J. Biol. Chem. 279 (2004) 34175–34182, http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M404317200.
[132] S.R. Wilkinson, D.J. Meyer, J.M. Kelly, Biochemical characterization of a trypanosome enzyme with glutathione-dependent peroxidase activity, Biochem. J. 352 (Pt 3) (2000) 755–761.
[133] S.R. Wilkinson, N.J. Temperton, A. Mondragon, J.M. Kelly, Distinct mitochondrial and cytosolic enzymes mediate trypanothione-dependent peroxide metabolism in *Trypanosoma cruzi*, J. Biol. Chem. 275 (2000) 8220–8225.
[134] S. Tripathy, S. Roy, Redox sensing and signaling by malaria parasite in vertebrate host, J. Basic Microbiol. 55 (2015) 1053–1063, http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201500031.
[135] S. Müller, T.W. Gilberger, Z. Krnajski, K. Lüersen, S. Meierjohann, R.D. Walter, Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite *Plasmodium falciparum*, Protoplasma 217 (2001) 43–49.
[136] S. Kehr, N. Sturm, S. Rahlfs, J.M. Przyborski, K. Becker, Compartmentation of redox metabolism in malaria parasites, PLoS Pathog. 6 (2010), http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1001242.
[137] S. Kehr, E. Jortzik, C. Delahunty, J.R. Yates, S. Rahlfs, K. Becker, Protein S-glutathionylation in malaria parasites, Antioxid. Redox Signal 15 (2011) 2855–2865, http://dx.doi.org/10.1089/ars.2011.4029.

3.2.1. Les superoxyde dismutases

Les superoxyde dismutases (SOD, EC 1.15.1.1) sont des enzymes majeures dans la dégradation des ROS puisqu'elles catalysent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène.

Quatre isoformes de SODs sont connues comportant un atome de cuivre ou de zinc (Cu/Zn-SODs), de manganèse (Mn-SODs), de fer (Fe-SODs) ou de nickel (Ni-SODs) (Fridovich 1989, 1995; Hwang *et al.* 2002). Les Mn-SODs et Fe-SODs présentent une structure similaire, mais différente de celle des Cu/Zn-SODs (Tainer *et al.* 1982; Parker et Blake 1988; Hwang *et al.* 2002). Les Cu/Zn-SODs et Mn-SODs sont présentes chez les bactéries, les champignons, les animaux et les plantes et sont essentielles pour leur cycle de vie. Les Cu/Zn-SODs sont cytosoliques alors que les Mn-SODs sont retrouvées dans la matrice mitochondriale pour les cellules eucaryotes (Hwang *et al.* 2003). Les Fe-SODs sont absentes chez les animaux et les champignons ; on les retrouve dans les cellules végétales, au niveau des chloroplastes (Miller 2012). Les Ni-SODs sont présentes chez les actinomycètes (Youn *et al.* 1996a,b; Barondeau *et al.* 2004) et les cyanobactéries (Palenik *et al.* 2003; Barondeau *et al.* 2004).

3.2.2. Les catalases

Les catalases (CAT, EC 1.11.1.6) sont un groupe de métalloenzymes tétramériques capables de décomposer le peroxyde d'hydrogène formé spontanément ou par action de la SOD, en eau et oxygène ($2\ H_2O_2 \rightarrow\ H_2O + O_2$) (Gessler *et al.* 2007). Ces enzymes sont retrouvées dans une grande diversité d'organismes : archaebactéries, bactéries, champignons, plantes et animaux. Les enzymes de la famille des catalases sont divisées en 3 sous-groupes : les catalases monofonctionnelles, les catalases peroxydases et les catalases à manganèse (Goldberg et Hochman 1989).

Les catalases monofonctionnelles, aussi appelées catalases typiques, sont présentes chez tous les organismes doués d'une respiration aérobie (Zámocký et Koller 1999). Ce sont des homotétramères possédant 4 groupements prosthétiques et dégradant le peroxyde d'hydrogène en deux étapes. La première étape consiste à oxyder l'hème de la catalase en oxyferryl avec une molécule de peroxyde d'hydrogène. Cette oxydation génère un radical cationique sur le noyau porphyrine qui va réduire une seconde molécule de peroxyde d'hydrogène, permettant la régénération de l'enzyme et la production d'eau et d'oxygène (Chelikani *et al.* 2004). Bien que considérées comme monofonctionnelles, ces enzymes sont impliquées dans d'autres réactions d'oxydation (Klotz *et al.* 1997).

Les catalases peroxydases (EC 1.11.1.21) sont présentes à la fois dans les cellules eucaryotes et les procaryotes. Ces enzymes sont des homodimères, mais des formes tétramériques ont aussi été décrites (Zámocký et Koller 1999). Elles sont bifonctionnelles et exercent une activité catalasique (EC 1.11.1.6) et peroxydasique (EC1.11.1.7). Ces protéines catalysent la dégradation du peroxyde d'hydrogène par l'activité catalase et peroxydase en présence d'un donneur d'électron pour former un composé oxydé et de l'eau. Les catalases peroxydases sont divisées en deux groupes en fonction de leur localisation : les catalases peroxydases intracellulaires et les catalases peroxydases extracellulaires qui comportent un peptide signal en position N-terminale pour la sécrétion (Zamocky *et al.* 2008).

Le dernier groupe est constitué des catalases à manganèse, aussi appelées pseudo-catalases ou catalases non-héminiques (Zámocký et Koller 1999; Chelikani *et al.* 2004). Sous-divisées en 5 clades, ces enzymes sont rencontrées essentiellement chez les bactéries lactiques et les organismes thermophiles (Zamocky *et al.* 2008).

3.2.3. Le système du glutathion

Le système du glutathion est composé de plusieurs enzymes incluant des glutathion peroxydases (GPX), des glutarédoxines (GRX) et des glutathion réductases (GR). Ces enzymes sont connues pour coopérer dans la dégradation du peroxyde d'hydrogène et des radicaux hydroperoxydes.

a) Les glutathion peroxydases

Les glutathion peroxydases (GPX, EC 11.11.1.9) ont été décrites pour la première fois dans les hémocytes comme impliquées dans la protection contre le stress oxydatif (Mills 1957; Herbette *et al.* 2007). On distingue deux familles de glutathion peroxydases, les glutathion peroxydases (GPX) et les phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydases (PHGPX) qui possèdent une sélénocystéine (Miramón *et al.* 2012). Les glutathion peroxydases sont des enzymes catalysant la dégradation du peroxyde d'hydrogène et les hydroperoxydes organiques en oxydant du glutathion (GSH) en glutathion disulfite (GSSG) plus eau et alcool correspondant au substrat initial (ROOH +2 GSH → ROH + GSSG + H_2O) (Grant 2001; Miramón *et al.* 2012; Lu et Holmgren 2014; Matamoros *et al.* 2015; Yang *et al.* 2016). Dans les cellules eucaryotes, les glutathion peroxydases sont les premières enzymes intervenant dans la dégradation des peroxydes (Yang *et al.* 2016).

Les PHGPX comportent du sélenium dans leur site actif, elles décomposent les radicaux hydroperoxyde lipidiques (ROOH + 2GSH → ROH +GSSG + H_2O) et sont moins dépendantes du glutathion (Conrad *et al.* 2007).

b) Les glutathion réductases

Les glutathion réductases (GR, EC 1.6.4.2) sont des enzymes de la famille des oxydoréductases pyridine disulfite contenant du FAD (Grant *et al.* 1996; Dickinson et Forman 2002), qui catalysent la réduction du glutathion disulfite (GSSG), en présence de $NADPH,H^+$ provenant de la voie des pentoses phosphates, en deux molécules de glutathion et $NADP^+$ (GSSG + $NADPH,H^+$ → 2GSH + $NADP^+$)(Grant *et al.* 1996; Dickinson et Forman 2002).

c) Les glutarédoxines

Les glutarédoxines (GRX) ont été isolées pour la première fois chez *Escherichia coli* (Holmgren 1989). Ce sont des enzymes cytosoliques ubiquitaires agissant comme une thiol oxydoréductase en réduisant les protéines disulfite ou GSH-protéine disulfite (Prot-SSG + GRX-SH → Prot-SH + GRX-SSG) (Shelton *et al.* 2005; Chaves *et al.* 2007; Chaves et Silva 2012), mais n'interagissant pas directement avec l'anion superoxyde (Chaves *et al.* 2007). La réaction de dégradation implique un résidu cystéinyl du site actif (Herrero *et al.* 2008). Deux types de GRX sont décrits, les glutarédoxines dithiol classiques possédant

deux résidus cystéinyl dans le site actif (R-S_2 + GRX-$(SH)_2$ → R-$(SH)_2$ + GRX-S_2; GRX-S_2 + 2GSH → GRX-$(SH)_2$ + GSSG) et des glutarédoxines monothiols avec un seul résidu cystéinyl dans le site actif (R-SSG + GRX-SH→ R-SH+ GRX-SSG; GRX-SSG +GSH → GRX-SH+ GSSG) (Herrero *et al.* 2008). Les glutarédoxines sont régénérées à l'aide du glutathion (GRX-SSG +GSH → GRX-SH +GSSG) (Shelton *et al.* 2005; Chaves *et al.* 2007; Chaves et Silva 2012).

3.2.4. Le système de la thiorédoxine

Le système de la thiorédoxine est composé des peroxyrédoxines (PRX), thiorédoxines (TRX) et thiorédoxine réductases (TRXR). Ces enzymes dégradent le peroxyde d'hydrogène et d'autres radicaux hydroperoxyde (Lu et Holmgren 2014).

a) Les peroxyrédoxines

Les peroxyrédoxines (PRX, EC 1.11.1.15) sont une famille ubiquitaire de peroxydases retrouvées chez tous les organismes vivants. Les peroxyrédoxines sont des protéines de la famille des thiols antioxydants qui comprend les thiorédoxine peroxydases et les alkyl hydroperoxyde réductases douées également d'une activité peroxydase (Missall *et al.* 2004; Srinivasa *et al.* 2012). Les peroxyrédoxines sont des agents antioxydants, mais elles sont aussi impliquées dans de nombreux mécanismes de signalisation cellulaire (Hall *et al.* 2011). De nombreuses peroxyrédoxines sont exprimées de manière constitutive à un fort niveau d'expression. Elles catalysent la dégradation des hydroperoxydes (Hall *et al.* 2011; Lu et Holmgren 2014). La réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques (alkyl hydroperoxydes, peroxynitrites) se fait en trois étapes (Wood *et al.* 2003b,a; Hall *et al.* 2011; Espinosa-Diez *et al.* 2015). Le résidu cystéinyl de la peroxyrédoxine permet une attaque nucléophile du substrat avec libération d'un alcool ou d'eau (ROOH+ PRX-$(SH)_2$ → ROH + PRX-SOH(SH)). Dans le cas de peroxyrédoxines possèdant deux résidus cystéinyl, le second peut prendre en charge une deuxième molécule (PRX-SOH(SH) + ROOH → ROH + PRX-$(SOH)_2$). La seconde étape est appelée résolution (PRX-SOH(SH) → H_2O + PRX-S_2), et la troisième permet de recycler l'enzyme grâce à la thiorédoxine (PRX-S_2 + 2R-SH → PRX-$(SH)_2$ + RSSR) (Wood *et al.* 2003b,a; Holmgren *et al.* 2005; Hall *et al.* 2011; Lu et Holmgren 2014; Espinosa-Diez *et al.* 2015). La famille des PRX peut être subdivisée en trois groupes : des PRX typiques avec deux résidus cystéinyl, des PRX atypiques possédant aussi deux résidus cystéinyl, et des PRX avec un seul résidu cystéinyl (Srinivasa *et al.* 2012). Les résidus cystéinyl sont hautement conservés dans le site actif et permettent la réduction du peroxyde d'hydrogène et des hydroperoxydes organiques (Hall *et al.* 2011; Espinosa-Diez *et al.* 2015).

b) Les thiorédoxines

Les thiorédoxines (TRX) sont de petites oxydoréductases dithiol impliquées dans le maintien du statut redox des cellules (Kontou *et al.* 2004; Lu et Holmgren 2014). Ce sont des cofacteurs essentiels dans la réparation des protéines. Les TRX réduisent les protéines disulfite et dithiolées dont le site actif comporte le motif CGPC avec deux résidus cystéinyl (Holmgren *et al.* 2005; Lu et Holmgren 2014). La réduction des TRX disulfite est catalysée par la thiorédoxine réductase et le recyclage de TRX-S_2 est assuré

par la réduction des protéines disulfite par la TRX (Prot-S_2 + TRX-$(SH)_2$ →Prot-$(SH)_2$ + TRX-S_2) (Holmgren *et al.* 2005).

c) Les thiorédoxine réductases

Les thiorédoxine réductases (TRXR, EC 1.8.1.9) sont les seules enzymes connues pour réduire la thiorédoxine. Ce sont des flavoprotéines homodimériques de la famille des nucléotide disulfite oxydoréductases (Williams 1995; Lu et Holmgren 2014). Elles sont impliquées dans le maintien du statut rédox dans les cellules (Williams 1995; Arnér et Holmgren 2000).

Deux classes sont connues :

- les TRXR de masse moléculaire élevée comportant deux sous-unités identiques de 55 kDa avec deux sites actifs (un motif CVNCGC en position N-terminale et un second en position C-terminale) (Lu et Holmgren 2014).
- Les TRXR de faible masse moléculaire, comportant deux sous-unités identiques de 35 kDa, mais un seul site actif (motif CXXC), ainsi qu'un domaine de fixation du FAD ou NADPH.

Alors que la première classe de TRXR est présente chez tous les organismes, les TRXR de classe II sont retrouvées au sein des archaebactéries, des bactéries, des champignons et des végétaux (Lu et Holmgren 2014). Les thiorédoxine réductases catalysent la réduction du TRX-S_2 en présence de NADPH et permettent ainsi le recyclage de la thiorédoxine (TRX-S_2 + NADPH,H^+→TRX-$(SH)_2$ + $NADP^+$) (Wood *et al.* 2003b,a).

3.2.5. Les autres peroxydases impliquées dans la dégradation des ROS

a) Les cytochrome C peroxydases

Les cytochrome C peroxydases (CCP, EC 1.11.1.5) catalysent la réduction d'hydroperoxydes organiques en eau ou alcool associé, mais elles sont moins efficaces que les catalases-peroxydases et glutathion peroxydases (Erman et Vitello 2002; Zámocký et Dunand 2006; Dantas *et al.* 2008). Ces enzymes permettent de détoxifier les ROS en 3 étapes, la première consiste à réduire les hydroperoxydes organiques (CCP + ROOH → CCP-compound I + ROH + H_2O) tandis que les deux étapes suivantes permettent de recycler la CCP avec l'utilisation de deux molécules de ferrocytochromes C.

b) Les chloride peroxydases ou chloroperoxydases

Les chloroperoxydases (CPO, EC 1.11.1.10) catalysent la réduction d'hydroperoxydes organiques (RH + Cl^- + H_2O_2 + H^+→ R-Cl + 2 H_2O) (van Rantwijk et Sheldon 2000; Fridovich 2001; Park et Clark 2006). Ces enzymes sont exclusivement rencontrées chez les champignons, mais elles ont été peu étudiées.

3.2.6. Les mécanismes enzymatiques impliqués dans la dégradation des RNS

a) Les flavohémoglobines

Les flavohémoglobines (FHB, EC 1.14.12.17) sont des protéines de la famille des globines (Zhu et Riggs 1992; Buisson et Labbe-Bois 1998; Liu *et al.* 2000; Forrester et Foster 2012). Ces protéines sont ubiquitaires, on les retrouve chez tous les organismes vivants ce qui suggère une origine ancienne (Zhu et Riggs 1992; Hardison 1998). Ces protéines sont constituées d'un domaine héminique N-terminal comportant le site actif, et d'un domaine de fixation du FAD ou NADPH hautement conservé en position C-terminale (Poole et Hughes 2000; Bonamore et Boffi 2008). Elles catalysent la conversion du NO en NO^-_3 en deux étapes. NO et O_2 réagissent ensemble pour oxyder le Fe^{2+} et libérer du NO^-_3 à proximité de l'hème de la flavohémoglobine ($NO + O_2 + Fe^{2+} \rightarrow$ (hème) $\rightarrow NO_3^- + Fe^{3+}$)(Forrester *et al.* 2011). Le Fe^{3+} formé est réduit (Fe^{3+} + NADPH$\rightarrow$ (Flavine) $\rightarrow Fe^{2+}$ + $NADP^+$) (Forrester *et al.* 2011). Cette réaction est 250 fois plus active comparée à la production d'oxyde nitrique par iNOS (Forrester *et al.* 2011).

b) Les nitrate et nitrite réductases

Les nitrates dérivés de la dégradation de l'oxyde nitrique par la flavohémoglobine sont utilisés par les microorganismes pour leur métabolisme par intervention des nitrate réductases et nitrite réductases (Marcos *et al.* 2016).

Les nitrate réductases aussi appelées nitrate oxydoréductases (NR, EC 1.6.6.3) sont des protéines homodimériques composées d'une région catalytique N-terminale avec un site de fixation de la molybdoptérine, d'une région centrale de type cytochrome b557 avec le site de fixation de l'hème et d'une région C-terminale de type cytochrome b réductase avec un site de fixation du FAD et de nucléotide pyridinique réduit (Campbell et Kinghorn 1990; Hall et Tomsett 2000). Ces protéines réagissent avec trois cofacteurs, le FAD, l'hème ferrique et le molybdène, indispensables à l'activité de l'enzyme (Campbell et Kinghorn 1990; Hall et Tomsett 2000). Le molybdène catalyse la réduction des nitrates en présence de donneurs d'électrons (Campbell et Kinghorn 1990). Chez les champignons, les nitrate réductases sont dépendantes du NAD(P)H ($NO_3^- + NAD(P)H + H^+ \rightarrow NO_2^- + NAD(P)^+ + H_2O$) (Campbell et Kinghorn 1990; Hall et Tomsett 2000).

Les nitrite réductases (NiR, EC 1.6.6.4) sont des homodimères utilisant le NAD(P) comme donneur d'électrons (Campbell et Kinghorn 1990; Siverio 2002). Elles sont composées d'un centre fer soufre et d'un groupe sirohème et requièrent la présence de FAD (Lancaster *et al.* 1979; Prodouz et Garrett 1981; Campbell et Kinghorn 1990; Siverio 2002). Les nitrite réductases catalysent la réduction des nitrites en ammonium (NO^-_2 + 3 NAD(P)H + $5H^+ \rightarrow NH_3$ + $3NADP^+$ + $2H_2O$) (Lancaster *et al.* 1979; Prodouz et Garrett 1981).

3.3. Le stress oxydatif et la mucoviscidose

Le stress oxydatif dans la mucoviscidose fait l'objet de nombreuses controverses.

La mucoviscidose est caractérisée par une réaction inflammatoire exacerbée au niveau pulmonaire, qui est entretenue par les infections et qui survient très tôt, dès l'enfance (Brennan 2008). Chez les patients atteints de mucoviscidose, les voies respiratoires sont exposées à un stress oxydatif important pouvant induire une inflammation à l'origine de la détérioration de la fonction pulmonaire (Brown *et al.* 1996; Hull *et al.* 1997; Starosta *et al.* 2006; Bui *et al.* 2012; Lezo *et al.* 2013; Voisin *et al.* 2014). Ce stress oxydatif a été identifié devant l'augmentation des concentrations en 8-hydroxydéoxyguanosine urinaire, et des ADN oxydés et lipides peroxydés (McGrath *et al.* 1999; Ziady et Hansen 2014). Un déséquilibre de la balance antioxydant/oxydant a également été rapporté, avec notamment un défaut de glutathion et un dépassement des autres mécanismes de défense (Domínguez *et al.* 1998; Brennan 2008; Bui *et al.* 2012; Hector *et al.* 2014; Ziady et Hansen 2014). La mutation F508del est associée à une surexpression de nombreux gènes participant à la réponse inflammatoire avec notamment une surexpression de gènes codant des interleukines et chimiokines ; cependant ces données peuvent variées selon le modèle expérimental étudié (Voisin *et al.* 2014). Il a notamment été démontré qu'il existe un dysfonctionnement du facteur de transcription Nrf2 (pour Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2) qui contrôle la réponse antioxydante et régule la réaction inflammatoire (Ziady et Hansen 2014).

La défense contre les bactéries passe par la sécrétion de ROS par les neutrophiles et macrophages et donc par l'augmentation de l'activité des oxydases dans ces cellules. Une étude récente a démontré que malgré une augmentation de la production des ROS, les phagocytes des patients atteints de mucoviscidose ont une activité bactéricide inférieure à ceux de patients sains. Ceci serait du notamment au défaut de transport des ions chlorure jusque dans le phagosome, d'où l'hypothèse de l'importance de l'acide hypochloreux et de la myéloperoxydase dans la défense contre les agents infectieux (Brennan 2008; Ziady et Hansen 2014; Nichols et Chmiel 2015).

Dans la mucoviscidose, les macrophages libèrent de manière excessive des médiateurs pro-inflammatoires (Bui *et al.* 2012; Lévêque *et al.* 2017). Les macrophages présentent également un déficit fonctionnel, à l'origine d'une réduction de la clairance des cellules en apoptose (Brennan 2008), ainsi que des défauts dans la reconnaissance des pathogènes et les capacités de phagocytose, d'où la persistance de l'infection **(Figure 19)** (Lévêque *et al.* 2017). Deux populations de macrophages sont décrites :

- les macrophages de type M1 qui sont activés par l'exposition à l'IFN-γ, au GM-CSF, au lipopolysaccharide (LPS) et autres produits bactériens, et produisent en réponse une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires comme TNF-α, IL6, IL1β, IL12, IL23, CCL2, avec libération de ROS (Lévêque *et al.* 2017).
- et les macrophages de type M2 qui sont polarisés après stimulation par des cytokines Th2 et sont associés aux fonctions anti-inflammatoire et homéostatique(Lévêque *et al.* 2017).

Les macrophages expriment eux aussi le gène *CFTR* ; les modèles murins et humains ont montré une réponse immunitaire anormale et une augmentation de l'inflammation associée à une altération des pattern recognition receptors (Nichols et Chmiel 2015; Bruscia et Bonfield 2016; Lévêque *et al.* 2017).

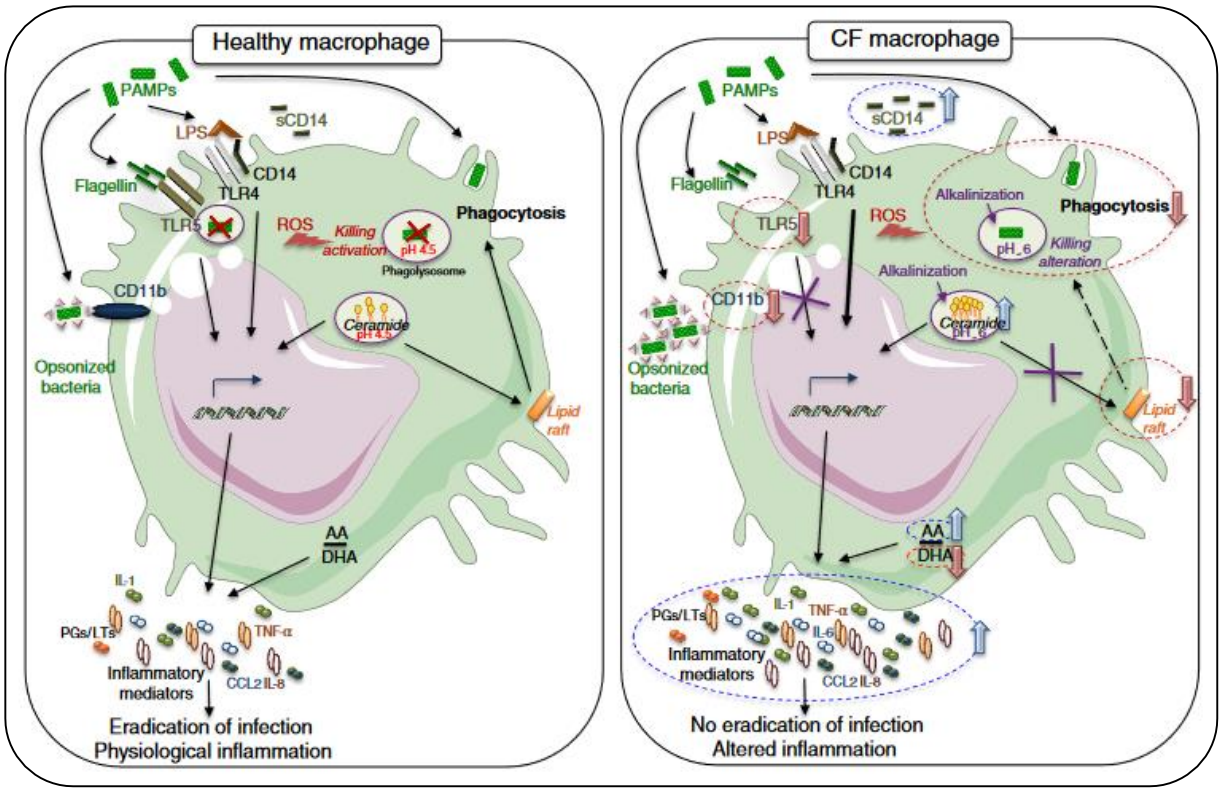


Figure 19: Comparaison de la réponse à *P. aeruginosa* par les macrophages de patients sains *vs.* patients atteints de mucoviscidose (Lévêque *et al.* 2017)

La figure compare la réponse inflammatoire à *Pseudomonas aeruginosa* par les macrophages de patients sains avec ceux de patients atteints de mucoviscidose. A gauche, chez les patients sains, le pathogène est reconnu par les pathogen recognition receptors TLR4 et TLR5 qui active une cascade de signalisation aboutissant à la synthèse de médiateurs pro-inflammatoire. TLR5 induit la production IL 1β production lors de la phagocytose de la bactérie. Les bactéries extracellulaires sont éliminées via les récepteurs non opsonique et opsonique, et CR 3 (CD11b/CD18) entraine l'opsonisation. Les bactéries opsonisées sont finalement détruites dans le phagolysosome. Au cours de l'infections des céramides sont libérées dans les macrophages sains, ces céramides vont former des plateformes membranaires enrichies en céramide qui assurent la transduction du signal et contribuent à la destruction bactérienne. A gauche, dans les macrophages de patients atteints de mucoviscidose, la signalisation par les TLR4 est augmentée avec une surproduction de médiateurs pro-inflammatoires alors que TLR5 n'est pas exprimé. Dans cette maladie, les macrophages présentent un déséquilibre en acides gras caractérisé par une augmentation en acide arachidonique (AA) et une diminution de l'acide docosahexaénoïque (DHA), favorisant l'inflammation. L'expression de la protéine CR 3 est également réduite, ce qui inhibe l'opsonisation des bactéries et favorisent leur persistance. La mutation de la protéine CFTR entraine l'alcalinisation des vésicules intracellulaires aboutissant à une augmentation des céramides intracellulaires. Ces céramides vont limiter la formation de radeau lipidiques et entraîner un défaut de la destruction des bactéries. De plus l'alcalinisation des phagolysosomes altèrent la destruction des bactéries.

IL, interleukine ; CCL2 : cytokine de type chimiokine ; LTs, leukotriens; PGs, prostaglandines ; TLR, Toll like receptor ; TNF-α, tumor necrosis factor-α

Dans la mucoviscidose, les neutrophiles sont recrutés continuellement au niveau des voies respiratoires où ils libèrent des composés toxiques, des protéases, et des oxydants impliqués dans la

dégradation de la fonction respiratoire (Hector *et al.* 2014). En effet, la libération de ROS par les neutrophiles entraîne la lyse des pathogènes, mais aussi une altération des protéines de défense innée et des récepteurs des neutrophiles ce qui inhibe la reconnaissance des pathogènes (Bui *et al.* 2012).

3.4. Utilisation d'inhibiteurs enzymatiques comme agents antimicrobiens

Avec l'augmentation de la fréquence de la résistance aux antimicrobiens, l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques apparaît indispensable pour le développement de nouveaux agents antimicrobiens. Dans ce contexte, les enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydatif pourraient constituer une cible de choix et des inhibiteurs de ces enzymes ont donc été évalués.

3.4.1. L'auranofin

Depuis quelques années, plusieurs études ont mis en lumière le potentiel antimicrobien de l'auranofin. L'auranofin qui correspond au 2,3,4,6-tétra-*o*-acétyl-1-thio-D-glucopyranosato-*S*-(triéthyl-phosphine) sous forme d'un complexe colloïdal, est commercialisé depuis les années 1980 comme agent anti-rhumatismal sous le nom de Ridaura®. L'auranofin inhibe l'oxydo-réduction de certaines enzymes telles que les thiorédoxines réductases, en formant des ponts disulfure par sa fixation aux groupements thiols, d'où une inhibition irréversible (Roder et Thomson 2015). Cette molécule et ses dérivés font l'object de deux brevets (Hill *et al.* 1978 ; Charles and Alber. 2016).

a) L'auranofin présente une activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de l'auranofin a été démontrée sur une grande diversité d'espèces bactériennes. Il est actif sur les bactéries à Gram +, notamment *Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Enterococcus faecium, Helicobacter pylori, M. tuberculosis, S. aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pneumoniae* et *Streptococcus agalactiae* (Jackson-Rosario *et al.* 2009; Cassetta *et al.* 2014; Hokai *et al.* 2014; Harbut *et al.* 2015; Fuchs *et al.* 2016; Díez-Martínez *et al.* 2016; Thangamani *et al.* 2016a,b; Owings *et al.* 2016) **(Tableau I)**. Il est particulièrement actif chez les espèces déficientes en glutathion qui agit comme un antagoniste (Fuchs *et al.* 2016). Concernant *S. aureus,* l'activité de l'auranofin est indépendante du profil de sensibilité aux antibiotiques (Cassetta *et al.* 2014; Hokai *et al.* 2014; Harbut *et al.* 2015; Fuchs *et al.* 2016; Thangamani *et al.* 2016a,b). L'auranofin utilisé à des concentrations équivalentes à la concentration minimale inhibitrice (CMI) présente une activité bactériostatique, alors qu'il s'agit d'une activité bactéricide à des concentrations plus élevées (Fuchs *et al.* 2016). Il est par ailleurs actif sur les *S. aureus* intracellulaires, induisant l'élimination de plus de 60% des bactéries (Thangamani *et al.* 2016a). Enfin, il est actif à la fois sur les cultures planctoniques et sur les biofilms (Thangamani *et al.* 2016b), et aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* dans différents modèles animaux d'infection (Harbut *et al.* 2015; Aguinagalde *et al.* 2015; Fuchs *et al.* 2016; Thangamani *et al.* 2016b,a).

Le mode d'action de l'auranofin a été déterminé : il agit sur plusieurs voies de biosynthèse (protéines, lipides) de manière concentration-dépendante. Il induit une différence d'expression pour 55%

des protéines, avec une sous-expression de protéines impliquées dans la synthèse de l'ADN, des ARN, et des composants de la paroi bactérienne. La modification de l'expression de ces protéines contribuerait à l'effet bactéricide de l'auranofin vis-à-vis de *S. aureus* (Thangamani *et al.* 2016a). L'auranofin inhibe l'activité des thiorédoxine réductases de *S. aureus, M. tuberculosis* et d'*H. pylori* avec des IC_{50} respectives de 90 ± 6 nM, 63 ± 3 nM et 88 nM (Harbut *et al.* 2015; Owings *et al.* 2016). Cependant la thiorédoxine réductase ne serait pas la seule cible de l'auranofin chez *S. aureus*, puisqu'il inhibe également la production de toxines comme la leucocidine de Panton-Valentine et l'α-hémolysine (Thangamani *et al.* 2016a) **(Tableau I)**. Ce mode d'action serait peu favorable au développement de résistance à l'auranofin, faisant de l'auranofin une molécule de choix en thérapeutique antibactérienne (Jackson-Rosario *et al.* 2009). De plus l'auranofin montre une synergie d'action avec certains antibiotiques comme la mupirocine, la rétapamuline, l'acide fusidique et l'amoxicilline (Thangamani *et al.* 2016b; Owings *et al.* 2016). Il présente aussi une action additive avec la clarithromycine ou le métronidazole (Owings *et al.* 2016).

L'absence d'activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à Gram – serait imputable à la présence du système du glutathion, qui est redondant avec le système thiorédoxine (Harbut *et al.* 2015), et/ou à la composition de la membrane externe (Thangamani *et al.* 2016a). Le traitement de bactéries à Gram- par un agent perméabilisant (polymyxine B nonapeptide) à concentration sub-inhibitrice associé à l'auranofin se traduit par une inhibition de la croissance bactérienne avec des CMI comprises entre 0,125 et 1 µg/mL (Thangamani *et al.* 2016a). De plus, il a été démontré que l'auranofin associé à des nanoparticules présentait une plus grande efficacité sur *S. pneumoniae* et *Streptococcus pyogenes*, avec même une protection contre l'infection dans le modèle zebrafish (Díez-Martínez *et al.* 2016).

b) L'auranofin présente une activité antifongique

L'activité antifongique de l'auranofin a aussi été évaluée : il est actif sur *Blastomyces dermatitidis, C. albicans, Cryptococcus (Cr.) neoformans* et *Saccharomyces cerevisiae* (Hokai *et al.* 2014; Gamberi *et al.* 2015; Fuchs *et al.* 2016; Wiederhold *et al.* 2017b)**(Tableau I)**. Son action sur *C. albicans* est cependant très limitée, de même que sur *Candida glabrata, Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis* **(Tableau I)**. (Fuchs *et al.* 2016; Wiederhold *et al.* 2017b). Pour ces levures, les CMI sont généralement supérieures à 16 µg/mL (Wiederhold *et al.* 2017b). L'auranofin inhibe par ailleurs la formation de biofilms à *C. albicans*, mais uniquement à concentration supérieure ou égale à 32 µg/mL. Il exerce une activité fongistatique vis-à-vis de *C. albicans*, alors qu'il a une action fongicide vis-à-vis de *Cr. neoformans* dès 2 µg/mL (Fuchs *et al.* 2016).

Le mécanisme d'action de l'auranofin a été étudié chez *S. cerevisiae*, l'auranofin n'entraîne pas d'augmentation significative de la production de ROS à 100 µM contrairement à ce observé chez d'autres espèces microbiennes, mais son action serait indépendante de la thiorédoxine réductase (Hokai *et al.* 2014). De nombreux gènes pourraient intervenir dans la résistance à l'auranofin chez *S. cerevisiae* comme *SOD2* et *GSH1* (Gamberi *et al.* 2015).

L'auranofin inhibe également la croissance du champignon dimorphique *Blastomyces dermatitidis* avec des CMI comprises entre 1 et 2 µg/mL (Wiederhold *et al.* 2016). Il est par contre inactif sur *A. fumigatus* et *R. oryzae* avec des CMI > 16 µg/mL (Wiederhold *et al.* 2016). Actuellement, le mécanisme d'action de l'auranofin sur *B. dermatitidis* n'a pas été investigué, mais les données sur son mode d'action vis-à-vis des bactéries, levures et parasites laissent supposer qu'il agirait comme inhibiteur des thiorédoxine réductases. Une étude récente a montré que la délétion de la peroxyrédoxine 1 et de la thiorédoxine réductase 1 de *Cr. neoformans* induisait une diminution de la croissance en présence d'auranofin (Thangamani *et al.* 2017b).

c) L'auranofin présente une activité antiparasitaire

L'auranofin présente une activité antiparasitaire vis-à-vis de divers protozoaires ou helminthes (Kuntz *et al.* 2007; Martínez-González *et al.* 2010; Song *et al.* 2012; Debnath *et al.* 2012; Tejman-Yarden *et al.* 2013; Andrade *et al.* 2014; Sharlow *et al.* 2014; Bulman *et al.* 2015; da Silva *et al.* 2016; Hopper *et al.* 2016) **(Tableau II)**. Il exerce une activité léthale sur les larves de filaires dermiques, comme sur les larves juvéniles hépatiques et les adultes de *Schistosoma mansoni* (Kuntz *et al.* 2007) ; il diminue par ailleurs la viabilité des adultes de *Schistosoma japonicum* (Song *et al.* 2012). Sur *Toxoplasma gondii,* il inhibe la multiplication des tachyzoïtes, à une dose trente fois inférieure à la dose toxique pour les cellules humaines. L'auranofin inhibe la multiplication des parasites, mais n'a pas d'effet sur l'invasion cellulaire (Andrade *et al.* 2014).

L'efficacité de l'auranofin a été évaluée *in vivo* sur des modèles murins d'infections, où il engendre une diminution de la charge parasitaire et de la réponse inflammatoire (Kuntz *et al.* 2007; Song *et al.* 2012; Debnath *et al.* 2012). Pour *T. gondii,* l'auranofin induit une protection des embryons de poulet et une diminution du nombre de parasites au niveau cérébral et hépatique (Andrade *et al.* 2014). Chez les animaux infectés par *Trypanosoma cruzi*, le traitement à base d'auranofin augmente la survie des animaux sans diminution de la charge parasitaire (da Silva *et al.* 2016), alors que chez les animaux infectés par *Leishmania major*, le traitement par l'auranofin inhibe la formation des lésions cutanées (Sharlow *et al.* 2014). L'efficacité de l'auranofin a également été évaluée sur un modèle murin d'infection vaginale à *Trichomonas fœtus*, où il engendre une réduction de la charge parasitaire (Hopper *et al.* 2016).

Le mécanisme d'action de l'auranofin a été investigué chez de nombreux parasites. L'auranofin cible des protéines comportant de nombreux résidus cystéinyl comme les thiorédoxine réductases **(Tableau II)**. L'auranofin inhibe également chez *S. mansoni,* une thiorédoxine glutathion réductase (Alger et Williams 2002; Angelucci *et al.* 2009, 2011; Song *et al.* 2012), mais n'a pas d'effet sur d'autres sélénoprotéines, comme la glutathion réductase ou la lactate deshydrogénase (Kuntz *et al.* 2007), alors que chez *Giardia lamblia* la TRXR ne serait pas la cible primaire de l'auranofin (Tejman-Yarden *et al.* 2013; Leitsch *et al.* 2016).

Enfin, chez *Trichomonas vaginalis,* l'auranofin inhibe l'activité de la TRXR, mais n'influence ni son expression ni sa dégradation (Hopper *et al.* 2016), et induit chez *Entamoeba histolytica,* la sous-expression

de gènes codant des protéines impliquées dans la mitose et le métabolisme nucléotidique, et inversement la surexpression de certains gènes impliqués dans la transduction du signal (Debnath *et al.* 2012) **(Tableau II)**.

Tableau I : Activité antimicrobienne de l'auranofin et ses cibles

Espèces	CMI (µg/mL)	Cibles	Sources
Bactéries			
Acinetobacter baumannii	16 - >32		Harbut *et al.* 2015; Aguinagalde *et al.* 2015; Thangamani *et al.* 2016a
Bacillus subtilis	0,05 – 0,5		Harbut *et al.* 2015; Fuchs *et al.* 2016
Clostridium difficile	205 - 274	Glycine réductase, D-proline réductase, Sélenophosphate synthétase	Jackson-Rosario *et al.* 2009
Clostridium perfringens			Jackson-Rosario *et al.* 2009
Clostridium tetani			Jackson-Rosario *et al.* 2009
Enterococcus casseliflavus	0,5		Aguinagalde *et al.* 2015
Enterococcus faecalis	0,125 – 2		Harbut *et al.* 2015; Aguinagalde *et al.* 2015; Fuchs *et al.* 2016; Thangamani *et al.* 2016a
Enterococcus faecium	1		Aguinagalde *et al.* 2015; Fuchs *et al.* 2016
Escherichia coli	8 - >100		Cassetta *et al.* 2014; Hokai *et al.* 2014; Aguinagalde *et al.* 2015; Thangamani *et al.* 2016a
Helicobacter pylori	329	Thiorédoxine réductase	Owings *et al.* 2016
Klebsiella pneumoniae	16 - 256		Harbut *et al.* 2015; Aguinagalde *et al.* 2015; Thangamani *et al.* 2016a
Mycobaterium tuberculosis	0,5	Thiorédoxine réductase	Harbut *et al.* 2015
Nocardia otitidiscaviarum	0,5		Aguinagalde *et al.* 2015
Pseudomonas aeruginosa	16 - > 256		Hokai *et al.* 2014; Harbut *et al.* 2015; Aguinagalde *et al.* 2015; Thangamani *et al.* 2016a
Salmonella typhimurium	128		Thangamani *et al.* 2016a
Staphylococus aureus	0,0625 – 2	Thiorédoxine réductase Leucocidine de Panton-Valentine α-hémolysine	Cassetta *et al.* 2014; Harbut *et al.* 2015; Aguinagalde *et al.* 2015; Fuchs *et al.* 2016; Thangamani *et al.* 2016a,b
Staphylococcus epidermidis	0,0625 -0,25		Cassetta *et al.* 2014; Thangamani *et al.* 2016b
Streptococcus agalactiae	0,0015 – 0,25		Aguinagalde *et al.* 2015; Thangamani *et al.* 2016a
Streptococcus pneumoniae	0,12 - 0,25		Aguinagalde *et al.* 2015; Thangamani *et al.* 2016a
Streptococcus pyogenes	0,12		Aguinagalde *et al.* 2015
Levures			
Candida albicans	1 - > 16		Wiederhold *et al.* 2017b; Thangamani *et al.* 2017b
Candida glabrata	0,25 - > 16		Fuchs *et al.* 2016; Wiederhold *et al.* 2017b; Thangamani *et al.* 2017b
Candida krusei	4 - 16		Wiederhold *et al.* 2017b
Candida parapsilosis	> 16		Wiederhold *et al.* 2017b
Candida tropicalis	4 - 16		Thangamani *et al.* 2017
Cryptococcus gatti	0,5 - 8		Thangamani *et al.* 2017
Cryptococcus neoformans	0,5 - > 16		Fuchs *et al.* 2016; Wiederhold *et al.* 2017b; Thangamani *et al.* 2017b
Saccharomyces cerevisiae	12 - > 100	Autre voie que thiorédoxine réductase, et glutathion réductase	Hokai *et al.* 2014; Gamberi *et al.* 2015
Champignons filamenteux (et dimorphiques)			
Aspergillus fumigatus	> 16		Wiederhold *et al.* 2017b
Blastomyces dermatitidis	1 – 2 (80%)		Wiederhold *et al.* 2017b
Lomentospora prolificans	8 - > 16		Wiederhold *et al.* 2017b
Rhizopus oryzae	> 16		Wiederhold *et al.* 2017b
Scedosporium apiospermum	2 - > 16		Wiederhold *et al.* 2017b

Tableau II : Activité antiparasitaire de l'auranofin et ses cibles

Espèces	CI_{50} (µM)	Cibles	Sources
Protozoaires			
Cryptosporidium parvum	2		Debnath *et al.* 2013; Andrade et Reed 2015
Entamoeba histolytica	0,5	Thiorédoxine réductase	Debnath *et al.* 2012, 2013; Parsonage *et al.* 2016
Giardia lamblia	4 – 16,8	Thiorédoxine oxydoréductase	Debnath *et al.* 2013; Tejman-Yarden *et al.* 2013; Andrade et Reed 2015; Leitsch *et al.* 2016
Leishmania amazonensis	0,27		Sharlow *et al.* 2014
Leishmania donovani	0,07		Sharlow *et al.* 2014
Leishmania major	0,07		Sharlow *et al.* 2014
Leishmania infantum	0,1	Trypanothione réductase	Ilari *et al.* 2012; Sharlow *et al.* 2014; Andrade et Reed 2015
Plasmodium falciparum	0,142	Thiorédoxine réductase	Müller *et al.* 2001; Sannella *et al.* 2008; Caroli *et al.* 2012; Andrade et Reed 2015
Trichomonas vaginalis		Thiorédoxine réductase	Coombs *et al.* 2004; Hopper *et al.* 2016
Helminthes			
Brugia malayi	0,3 – 1,1	Thiorédoxine réductase	Bulman *et al.* 2015
Brugia pahangi	0,1 – 0,3		Bulman *et al.* 2015
Brugia microtti		Thiorédoxine réductase	Zhao *et al.* 2016
Echinococcus granulosus			Andrade et Reed 2015
Haemonchus contortus		Thiorédoxine réductase	Hudson *et al.* 2010; Plancarte *et al.* 2017
Loa loa	12,8		Bulman *et al.* 2015
Onchocerca ochengi	0,3 – 3		Bulman *et al.* 2015
Onchocerca volvulus	0,3		Bulman *et al.* 2015
Schistosoma japonicum, *Schistosoma mansoni*		Thiorédoxine glutathion réductase	Alger et Williams 2002; Kuntz *et al.* 2007; Angelucci *et al.* 2009; Song *et al.* 2012
Taenia crassiceps			Rendón *et al.* 2004; Guevara-Flores *et al.* 2010; Martínez-González *et al.* 2015
Taenia solium			Plancarte et Nava 2015

3.4.2. L'ebsélen et ses analogues

L'ebsélen est un composé hétérocyclique mimant l'activité de la glutathion peroxydase. Ce composé doué de propriétés antioxydantes a démontré une activité antimicrobienne, de même que ses analogues (Wójtowicz *et al.* 2004). Cette molécule a été développée par la société DAIICHI-SANKYO (Tokyo, Japon) en 1997 pour le traitement des ischémies cérébrales, mais s'est révélée inefficace lors des tests cliniques de phase 3 (Ngo *et al.* 2016a). Cette molécule et ses dérivés font l'objet d'un brevet (Holmgren *et al.* 2013).

a) L'ebsélen présente une activité antibactérienne

L'ebsélen présente une activité antibactérienne vis-à-vis de nombreuses bactéries à Gram + comme *Bacillus anthracis, B. subtilis, E. faecalis, E. faecium, Mycobacterium smegmatis, Listeria monocytogenes, S. aureus* et *S. epidermidis* quelque soit leur profil de résistance aux antibiotiques, alors qu'il présente une activité plus limitée contre les bactéries à Gram – comme *Acinetobacter baumannii, E. coli, Klebsiella pneumoniae, P. aeruginosa, Serratia marcescens* et *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* **(Tableau III)** (Wójtowicz *et al.* 2004; Lu *et al.* 2013a; Thangamani *et al.* 2015a; Younis *et al.* 2015; Thangamani *et al.* 2015b; Gustafsson *et al.* 2016; Ngo *et al.* 2016a). Certains analogues de

l'ebsélen présentent une activité antimicrobienne plus intéressante (Wójtowicz *et al.* 2004; Gustafsson *et al.* 2016; Ngo *et al.* 2016a).

L'ebsélen est particulièrement actif sur les bactéries déficientes en système du glutathion. Sur des isolats de *S. aureus* présentant différents profils de résistance, il a été montré que l'ebsélen inhibe la synthèse d'acides nucléiques et de lipides, mais aussi la synthèse de la leucocidine de Panton-Valentine et de l'α-hémolysine **(Tableau III)**. Il inhibe également l'adhérence des biofilms et diminue leur biomasse à des concentrations non toxiques pour les cellules animales. Il a été utilisé dans un modèle murin d'infection, dans lequel il engendre une diminution significative de la charge bactérienne et de la réaction inflammatoire. Une synergie d'action a aussi été démontrée en présence d'acide fusidique, de clindamycine, d'érythromycine, de mupirocine, de rétapamuline et de rifampicine. Il est aussi capable de réduire le nombre de SARM intracellulaires (Thangamani *et al.* 2015a,b).

L'absence d'activité sur les bactéries à Gram – pourrait être due à un défaut de pénétration de l'ebsélen à travers la membrane externe (Thangamani *et al.* 2015b) ou à la redondance importante des systèmes de la thiorédoxine et du glutathion. En effet chez *E. coli,* le traitement d'une souche invalidée pour la synthèse de glutathion se traduit par une augmentation du taux de thiorédoxine oxydée, confirmant l'inhibition de la TRXR par l'ebsélen (Gustafsson *et al.* 2016). Ces données sont en accord avec celles précédemment rapportées par Lu *et al*. (Lu *et al.* 2013a), qui avaient démontré que l'ebsélen forme des ponts sélénosulfite avec la TRXR d'*E. coli* en se liant au résidu cystéinyl du site actif. L'invalidation du gène codant le facteur de transcription OxyR ou la glutathion synthétase entraîne une augmentation de la sensibilité à l'ebsélen, alors que l'invalidation du gène codant la thiorédoxine (TRX) entraîne une résistance (Lu *et al.* 2013a). Chez *H. pylori,* l'ebsélen exercerait une activité antibactérienne en inhibant la TRXR comme chez *E. coli* (Lu *et al.* 2013a; Zou *et al.* 2017) **(Tableau III)**.

L'ebsélen influencerait également la fonctionnalité des macrophages ; en effet le sélénium renforcerait la stimulation de l'immunité cellulaire en présence de *S. aureus* (Bi *et al.* 2016).

b) L'ebsélen présente une activité antifongique

L'ebsélen et ses analogues sont capables de diminuer ou d'inhiber la croissance des levures du genre *Candida*, notamment *C. albicans,* mais aussi des cryptocoques (*Cr. gattii, Cr. neoformans*) et de *S. cerevisiae,* ou de champignons filamenteux, notamment certaines espèces du genre *Aspergillus* ou *Fusarium* ainsi que des *Penicillium* comme *P. chrysogenum* et *P. citrinum* (Soteropoulos *et al.* 2000; Wójtowicz *et al.* 2004; Chan *et al.* 2007; Miorelli *et al.* 2008; Billack *et al.* 2009; Azad *et al.* 2012; Venturini *et al.* 2016; Ngo *et al.* 2016a; Chassot *et al.* 2016; Thangamani *et al.* 2017a) **(Tableau III)**. L'activité antifongique est dose-dépendante : à faible concentration, l'ebsélen exerce une activité fongistatique alors qu'il s'agit d'une activité fongicide à forte concentration (Billack *et al.* 2009).

L'ebselen se fixerait sur les protéines comportant des résidus cystéinyl comme la H-ATPase de *C. albicans* et *S. cerevisiae* (Billack *et al.* 2009; Orie *et al.* 2017), ou d'autres enzymes impliquées dans la synthèse protéique, des protéines glycosylées, des glutamate deshydrogénases ou encore des protéines

chaperonnes comme les peroxyrédoxines (Azad *et al.* 2012) **(Tableau III)**. Une synergie d'action est observée avec l'amphotéricine B, le voriconazole et la caspofungine (Venturini *et al.* 2016)**.**

c) L'ebsélen présente une activité antiparasitaire

L'activité antiparasitaire de l'ebsélen a été étudiée principalement contre les trypanosomes, notamment *Trypanosoma brucei brucei, Tr. brucei gambiense, Tr. brucei rhodesiense* et *Tr. cruzi.* Il est également efficace contre les promastigotes de *Leishmania tropica* (Sharlow *et al.* 2010; Lu *et al.* 2013b; Joice *et al.* 2013; Gordhan *et al.* 2017) **(Tableau IV)**, à des concentrations de 50 à 250 fois inférieures à la dose toxique pour les cellules de mammifères (Lu *et al.* 2013b).

Certains analogues, comme l'ebsulfure, ont démontré une activité antiparasitaire plus importante (Lu *et al.* 2013b). Ces molécules inhibent l'hexokinase *Tb*HK1 (Sharlow *et al.* 2010; Joice *et al.* 2013; Gordhan *et al.* 2017) et la trypanothione réductase de *Tr. brucei*, en se liant aux résidus cystéinyl de ces protéines (Lu *et al.* 2013b). Chez *Haemonchus contortus,* une nouvelle thiorédoxine réductase a été identifiée comme cible de l'ebsélen (Plancarte *et al.* 2017). *In vivo*, dans un modèle murin d'infection à *Tr. brucei brucei*, l'utilisation de l'ebsulfure a été corrélée à une diminution de la parasitémie (Lu *et al.* 2013b) **(Tableau IV)**.

Tableau III : Activité antimicrobienne de l'ebsélen et ses cibles chez les bactéries, levures et champignons filamenteux

Espèces	CMI_{90} (µg/mL)	Cibles	Références
Bactéries			
Acinetobacter baumannii	15,6 – 16		Thangamani *et al.* 2015a; Ngo *et al.* 2016b
Bacillus anthracis	0,275	Thiorédoxine réductase	Gustafsson *et al.* 2016
Enterobacter cloacae	> 125		Ngo et al. 2016b
Enterococcus faecalis	0,0625 – 1		Thangamani *et al.* 2015a; Ngo *et al.* 2016b
Escherichia coli	7,8 – 32	Thiorédoxine réductase	Lu et al. 2013a; Thangamani et al. 2015a; Ngo et al. 2016b; Zou et al. 2017
Helicobacter pylori	3,13 - 12,5		Kumar *et al.* 2010
Klebsiella pneumoniae	64 - > 125		Thangamani *et al.* 2015a; Ngo *et al.* 2016b
Listeria monocytogenes	1		Ngo *et al.* 2016b
Mycobacterium smegmatis	7,8		Ngo *et al.* 2016b
Mycobacterium tuberculosis	20		Lu *et al.* 2013a
Pseudomonas aeruginosa	> 256		Thangamani *et al.* 2015a; Ngo *et al.* 2016b
Salmonella enterica	> 125		Thangamani *et al.* 2015a
Salmonella typhimurium	32		Thangamani *et al.* 2015a
Staphylococcus aureus	0,125 – 7,8	Leucocidine de Panton-Valentine α-hémolysine, Thiorédoxine réductase	Thangamani *et al.* 2015a,b; Gustafsson *et al.* 2016; Ngo *et al.* 2016b
Staphylococcus epidermidis	0,25 - 0,5		Thangamani *et al.* 2015a,b; Ngo *et al.* 2016b
Streptococcus pyogenes	0,5		Thangamani *et al.* 2015a
Streptococcus agalactiae	0,5		Thangamani *et al.* 2015a
Levures			
Candida albicans	1 - > 12,5		Billack *et al.* 2010; Ngo *et al.* 2016a; Thangamani *et al.* 2017a; Orie *et al.* 2017
Candida glabrata	0,56 - 1,56		Ngo *et al.* 2016a; Thangamani *et al.* 2017a
Candida krusei	1,56		Ngo *et al.* 2016a
Candida parapsilosis	1 - 6,25		Ngo *et al.* 2016a; Thangamani *et al.* 2017a
Candida tropicalis	2		Thangamani *et al.* 2017a
Cryptococcus gatti	0,5 – 2		Thangamani *et al.* 2017a
Cryptococcus neoformans	0,25 – 1		Thangamani *et al.* 2017a
Saccharomyces cerevisiae	0,7 -1,26	Glutamate deshydrogénase, H-ATPase	Chan *et al.* 2007; Billack *et al.* 2010; Azad *et al.* 2012
Champignons filamenteux			
Aspergillus flavus	6,25		Ngo *et al.* 2016a
Aspergillus nidulans	1,56		Ngo *et al.* 2016a
Aspergillus terreus	1,56		Ngo *et al.* 2016a
Fusarium chlamydosporum	2 – 4		Venturini *et al.* 2016
Fusarium oxysporum	2 – 8		Venturini *et al.* 2016
Fusarium proliferatum	2 – 4		Venturini *et al.* 2016
Fusarium solani	4 – 8		Venturini *et al.* 2016
Fusarium sporotrichioides	2		Venturini *et al.* 2016
Fusarium verticillioides	4 – 8		Venturini *et al.* 2016

Tableau IV: Activité antiparasitaire de l'ebsélen et ses cibles

Espèces	CI_{50} (µM)	Cibles	Références
Haemonchus contortus		Thiorédoxine réductase	Plancarte *et al.* 2017
Leishmania major	20		Lu *et al.* 2013b
Trypanosoma brucei		Hexokinase, trypanothione réductase	Sharlow *et al.* 2010; Lu *et al.* 2013b; Joice *et al.* 2013; Gordhan *et al.* 2017
Trypanosoma b. brucei	0,092		Lu *et al.* 2013b
Trypanosoma b. rhodesiense	0,263		Lu *et al.* 2013b
Trypanosoma b. gambiense	0,061		Lu *et al.* 2013b
Trypanosoma cruzi	1,3		Lu *et al.* 2013b

3.4.3. La conoïdine A

L'activité antimicrobienne de la conoïdine A, un inhibiteur des peroxyrédoxines, n'a pas été évaluée. Par contre, il a été identifié une activité antiparasitaire. La conoïdine A inhibe l'invasion cellulaire par *T. gondii* (Robertson 2005). Elle agirait en ciblant la peroxirédoxine II du parasite (*Tg*PrxII) et une autre protéine nommée *Tg*CBAP (Tilley *et al.* 2014), et réagirait avec les groupements thiol et amine des protéines (Robertson 2005; Haraldsen *et al.* 2009). La peroxirédoxine II de *T. gondii* est impliquée dans la réponse au stress oxydatif, et la conoïdine A se lierait aux cinq résidus cystéinyl de la protéine, inhibant ainsi son activité (Wood *et al.* 2003b; Haraldsen *et al.* 2009; Liu *et al.* 2010). Par ailleurs, les tachyzoïtes de *T. gondii* présentent quatre PRX putatives dont l'activité serait inhibée par la conoïdine A (Ding *et al.* 2004; Haraldsen *et al.* 2009).

La conoïdine B est capable d'inhiber l'activité de la *Tg*PrxII recombinante en se liant au résidu cystéinyl du site actif (Liu *et al.* 2010). Des analogues de la conoïdine A ont été développés par Liu *et al.* (Liu *et al.* 2010), qui seraient plus actifs sur *T. gondii* **(Tableau V)**.

Chez *Ancylostoma ceylanicum*, les conoïdines A et B sont toutes deux capables d'inhiber l'activité de l'*Ace*Prx-1 en se liant aux résidus cystéinyl (Nguyen *et al.* 2013) **(Tableau V)**. Chez les *Plasmodium* qui sont déficients en catalase, et pour lesquels le système de la thiorédoxine est indispensable à la protection contre le stress oxydatif, il a été démontré que l'activité de la PRX2 de l'hôte était détournée par le parasite, et qu'elle était inhibée par la conoïdine A **(Tableau V)**.Cette molécule inhibe la croissance de *P. falciparum* quelque soit le profil de résistance aux antipaludéens, en entraînant un défaut de maturation des trophozoïtes. La conoïdine A présente un effet synergique avec la chloroquine (Brizuela *et al.* 2014). Elle a une faible spécificité et peut se lier aux peroxyrédoxines des parasites, mais aussi aux peroxyrédoxines II et IV humaines (Nguyen *et al.* 2013) et serait donc toxique pour les cellules humaines.

Tableau V : Activité antiparasitaire de la conoïdine A et ses cibles

Espèces	IC_{50} (µM)	Cibles	Sources
Ancylostoma ceylanicum		Peroxyrédoxine	Nguyen *et al.* 2013
Plasmodium falciparum	750 – 900		Brizuela *et al.* 2014
Toxoplasma gondii		Peroxyrédoxine	Haraldsen *et al.* 2009; Liu *et al.* 2010

D'autres molécules se sont montrées capables d'inhiber l'activité des thiorédoxine réductases, comme le curcumin et la théaflavine (Hudson *et al.* 2010). Des métabolites d'*Aspergillus versicolor,* appelés versiquinazolines A, B, C et K, présentent également une activité inhibitrice des thiorédoxine réductases avec des IC_{50} de 12 à 20 µM (Cheng *et al.* 2016)

Objectifs

Les travaux expérimentaux menés au cours de ma thèse avaient pour objectif de comprendre les mécanismes enzymatiques mis en jeu par *S. apiospermum* pour se protéger du stress oxydatif, notamment dans le contexte de la mucoviscidose, afin d'identifier certains des facteurs de pathogénicité et donc de nouvelles cibles thérapeutiques.

Le stress oxydatif est un mécanisme clé dans la défense de l'organisme contre les agents infectieux comme le démontre la fréquence des infections respiratoires chez les patients atteints de granulomatose chronique familiale (Goldblatt 2014; Buvelot *et al.* 2017). Pour engendrer une infection, les pathogènes doivent donc être capables de se protéger contre le stress oxydatif. Dans ce but, ils ont développé une grande variété de mécanismes moléculaires visant à maintenir l'intégrité cellulaire. Ils disposent notamment d'une batterie d'enzymes leur permettant de dégrader les espèces oxygénées réactives (ROS), dont des superoxyde dismutases (SOD), des catalases, et diverses protéines des systèmes du glutathion et de la thiorédoxine (Belozerskaya et Gessler 2007; Gessler *et al.* 2007; Dantas *et al.* 2015; Staerck *et al.* 2017). La réponse aux espèces azotées réactives (RNS) met en jeu des flavohémoglobines, des nitrate et nitrite réductases (Lancaster *et al.* 1979; Prodouz et Garrett 1981; Hall et Tomsett 2000; Fang 2004; Belozerskaya et Gessler 2007; Gessler *et al.* 2007; Forrester *et al.* 2011; Forrester et Foster 2012; Marcos *et al.* 2016). Dans ce contexte, nous avons entrepris d'identifier ces enzymes chez les *Scedosporium* et de déterminer leur importance dans la pathogénèse des scédosporioses.

Ces travaux se sont donc organisés autour de cinq grands axes :

- L'étude de la germination des spores en condition de stress oxydatif chimique, et la comparaison d'isolats cliniques et d'isolats environnementaux des principales espèces du genre *Scedosporium,*
- L'identification des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif, étude qui a été menée sur *S. apiospermum* et *S. boydii.* Chez *S. boydii,* l'expression de deux gènes codant la catalase A1 et la superoxyde dismutase cytosolique SodC a été étudiée en condition de stress oxydatif. Puis avec la disponibilité du génome de *S. apiospermum*, nous avons identifié pour ce champignon l'ensemble des gènes potentiellement impliqués et leur expression a été étudiée dans différentes conditions de stress oxydatif.
- La production de mutants défectifs pour certains gènes de détoxification des ROS chez *S. apiospermum,*
- L'évaluation d'inhibiteurs enzymatiques ciblant les protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif, utilisés isolément ou en association avec des antifongiques triazolés,
- Enfin, la standardisation du sérodiagnostic des infections à *Scedosporium*, via la production de protéines recombinantes mimant certaines de ces enzymes, afin de faciliter la détection des infections à *Scedosporium*. Pour cela, un test ELISA mettant en jeu la reconnaissance de deux protéines recombinantes mimant la catalase A1 et la superoxyde dismutase SodC de *S. apiospermum* a été mis au point.

Travail expérimental

1. Etude de la germination en condition de stress oxydatif chimique

Varying susceptibility of clinical and environmental *Scedosporium* isolates to chemical oxidative stress in conidial germination

Cindy STAERCK[1], **Charlotte GODON**[1], **Jean-Philippe BOUCHARA**[1,2] **and Maxime J.J. FLEURY**[1]

[1]Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), UNIV Angers, UNIV Brest, Université Bretagne-Loire, Angers, France
[2] Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

Soumis pour publication

Résumé

Les *Scedosporium* sont des pathogènes opportunistes responsables d'une grande variété d'infections survenant chez des individus immunodéprimés comme chez l'immunocompétent. Ces champignons sont notamment à l'origine d'infections respiratoires au cours de la mucoviscidose. Dans ce contexte, le genre *Scedosporium* se situe au deuxième rang parmi les champignons filamenteux colonisant l'appareil respiratoire. Jusqu'à un passé très récent, les données disponibles sur les mécanismes d'échappement des spores inhalées aux défenses immunitaires de l'hôte étaient très parcellaires. Lors d'une infection, la reconnaissance du microorganisme par les cellules phagocytaires induit dans ces dernières une explosion respiratoire avec libération d'espèces oxygénées réactives à l'origine d'un stress oxydatif. Pour coloniser les voies respiratoires, les spores doivent être capables de dégrader les espèces oxygénées réactives pour germer et produire les filamnts mycéliens. Au cours de cette étude, la capacité à germer des spores d'isolats cliniques et environnementaux des cinq principales espèces du genre *Scedosporium* a été étudiée. Nous avons démontré qu'à des degrés variables, tous les isolats sont sensibles au stress oxydatif. Au sein d'une même espèce, les isolats environnementaux apparaissent plus résistants que les isolats cliniques au stress oxydatif. Parmi les isolats environnementaux, ceux de *S. aurantiacum* sont les plus résistants au stress oxydatif. Par ailleurs, les isolats de *S. dehoogii* sont particulièrement sensibles au stress oxydant. Les différences observées entre les espèces du genre *Scedosporium* dans la capacité de germination en condition de stress oxydatif pourraient expliquer les différences de pathogénicité et donc de prévalence dans la mucoviscidose.

Mots-clés: Germination des spores, ROS, Stress oxydatif, *Scedosporium*

Varying susceptibility of clinical and environmental *Scedosporium* isolates to chemical oxidative stress in conidial germination

Cindy STAERCK[1], **Charlotte GODON**[1], **Jean-Philippe BOUCHARA**[1,2] **and Maxime J.J. FLEURY**[1]

[1]Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), UNIV Angers, UNIV Brest, Université Bretagne-Loire, Angers, France

[2] Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

JPB and MJJF are members of the ECMM/ISHAM (European Confederation of Medical Mycology / International Society for Human and Animal Mycology) working group *Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis* (*Fri-CF*).

Correspondance: Maxime J.J. Fleury, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, EA 3142, Institut de Biologie en Santé-IRIS, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. Phone: +33 (0)2 44 68 83 68; e-mail: maxime.fleury@univ-angers.fr

Abstract

Scedosporium species are opportunistic pathogens causing a great variety of infections in both immunocompetent and immunocompromised individuals. The *Scedosporium* genus ranks the second among the filamentous fungi colonizing the airways of patients with cystic fibrosis (CF), after *Aspergillus fumigatus,* and most species are capable to chronically colonize the respiratory tract of these patients. Nevertheless, few data are available regarding evasion of the inhaled conidia to the host immune response. Upon microbial infection, macrophages and neutrophils release reactive oxygen species (ROS). To colonize the respiratory tract, the conidia need to germinate despite the oxidative stress generated by phagocytic cells. Germination of spores from different clinical or environmental isolates of the major *Scedosporium* species was investigated in oxidative stress conditions. All tested species showed susceptibility to oxidative stress. However, when comparing clinical and environmental isolates, differences in germination capabilities under oxidative stress conditions were seen between species as well as within each species. Among environmental isolates, *Scedosporium aurantiacum* isolates were the most resistant to oxidative stress. Overall, the differences observed between *Scedosporium* species in the capacity to germinate under oxidative stress conditions could explain their varying prevalence and pathogenicity.

Keywords: Conidial germination, ROS, Oxidative stress, *Scedosporium* species

Introduction

Scedosporium species which belong to the Ascomycota phylum and the order Microascales, are saprophytic fungi found in human-impacted environments as polluted soils and contaminated water (for a review on the ecology of these fungi, see Rougeron *et al.* 2017). The genus *Scedosporium* comprises at least ten species, with five of them causing the majority of human infections, *i.e. Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium boydii*, *Scedosporium minutisporum* and *Scedosporium dehoogii* (Ramirez-Garcia *et al.* 2017). These filamentous fungi may cause a large variety of diseases ranging from localized infections such as subcutaneous mycetoma resulting from traumatic inoculation of some soil fungal elements, to disseminated infections in immunocompromised individuals through inhalation of some airborne conidia by a receptive host (Guarro *et al.* 2006; Cortez *et al.* 2008; Bouchara *et al*. 2009). However, *S. dehoogii* has never been described as yet as a causative agent of respiratory infections.

Recently, *Scedosporium* species have been worldwide recognized as significant pathogens in patients with cystic fibrosis (CF). The *Scedosporium* genus ranks the second among the filamentous fungi colonizing the airways of CF patients, after *Aspergillus fumigatus,* with a prevalence rate ranging from 3 to 17.4% depending to the studies (Cimon *et al.* 2000; Pihet *et al.* 2008; Horré and Marklein 2009; Horré *et al.* 2009; Blyth *et al.* 2010a,b; Sedlacek *et al.* 2015; Ziesing *et al.* 2016). In this clinical context, species distribution greatly varies from one country to another, with the predominant species being *S. aurantiacum* in Australia (Blyth *et al.* 2010b), *S. boydii* in France (Zouhair *et al.* 2013) and *S. apiospermum* in Germany (Sedlacek *et al.* 2015), whereas *S. minutisporum* is always poorly represented. Nevertheless, all four species are capable to cause a chronic colonization of the airways (Defontaine *et al.* 2002; Zouhair *et al.* 2013), which constitutes a risk factor for disseminated infections in case of lung or heart-lung transplantation (Symoens *et al*. 2006; Peghin *et al.* 2016; Thomson *et al.* 2015; Balandin *et al.* 2016; Parize *et al.* 2017), notably because of their limited susceptibility to current antifungal drugs (Gilgado *et al*. 2006; Alestruey-Izquierdo *et al*. 2007; Lackner *et al.* 2012). Development of more potent antifungals is required, which may result from a better knowledge of the pathogenic mechanisms of these fungi.

In the environment, fungi are submitted to different oxidative stresses, generated by solar UV radiations (Griffiths *et al.* 1998), starvation (Jakubowski *et al.* 2000) or the intermicrobial competition (Nathan and Cunningham-Bussel 2013). These oxidative stresses are known to damage macromolecules such as proteins, nucleic acids and lipids, thus leading to fungal death. Likewise, within the respiratory tract of the patients, conidia must evade the host immune defences (Gessler *et al.* 2007; Heller and Tudzynski 2011). In human, macrophages and neutrophils are among the major effector cells of the innate immune response against fungi, killing the inhaled conidia by phagocytosis or by the release of reactive oxygen species (ROS) such as superoxide anions and hydrogen peroxide (Nathan and Shiloh 2000; Fang 2004). Therefore, to colonize the respiratory tract, the inhaled conidia should be able to cope the oxidative stress generated by phagocytic cells. In this aim, fungi have developed various enzymatic mechanisms (Staerck *et al.* 2017a,b).

Spore germination is an essential step during life cycle of fungi (van Burik and Magee 2001; Osherov and May 2001; Gow *et al.* 2002). Waldorf (1989) has demonstrated that macrophages have a role in preventing spore germination of *A. fumigatus,* and failure of macrophages to prevent germination allows the fungal growth, *i.e.* production of hyphae and their elongation, and therefore infection. Schaffner *et al*. (1982) also showed that macrophages prevent germination of *A. fumigatus* conidia while neutrophils participate to protection against the hyphae. Likewise, sensibility of *Galleria mellonella* to *A. fumigatus* infection is dependent on the germination stage, resting or swollen conidia being less virulent than germ tubes since conidia were phagocytosed by haemocytes while germ tubes were not (Renwick *et al.* 2006).

Here we investigated germination of the conidia of the major *Scedosporium* species in two oxidative stress conditions searching for differences between species or between clinical and environmental isolates.

Materials and methods

Fungal isolates and culture conditions

This study was conducted on a panel of 21 *Scedosporium* isolates, including five *S. apiospermum,* five *S. aurantiacum,* five *S. boydii*, four *S. dehoogii* and two *S. minutisporum* isolates **(Table 1)**. Apart from *S. dehoogii,* the panel of isolates comprised for each species both clinical isolates recovered from sputum samples from CF patients and environmental isolates (only environmental isolates were tested for *S. dehoogii*). Isolates were maintained at 4°C on Yeast-Peptone-Dextrose-Agar (YPDA; containing in g/L: yeast extract, 5; peptone, 10; glucose, 20; and agar, 20) slants containing 0.5 g/L chloramphenicol. Species identification of these isolates was based on sequencing the internal transcribed spacer regions of ribosomal RNA genes, the calmodulin locus or locus BT2 or b-TUB of the tubulin gene and MALDI-TOF/mass spectrometry analysis (Sitterlé *et al*. 2014).

Conidial germination and effects of chemical oxidative stress

Conidia were obtained from 7-day-old cultures on YPDA with chloramphenicol, by scraping the agar plates with sterile distilled water as previously described (Ghamrawi *et al*. 2015). Hyphae were then removed by filtration through 20-µm pore size nylon membranes, and conidia were enumerated by hematocytometer counts and adjusted to 4 x 10^5/mL in YPD broth. Aliquots of the conidial suspension were then deposited in the wells (100 µL per well) of 96 well microtiter plates (Greiner bio-one, Kremsmünster, Austria). Menadione (Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or paraquat (Sigma Aldrich) was then added to the wells (100 µL per well of a 10 to 110 µmol/L menadione or 1 to 11 mmol/L paraquat solution in YPD broth). After 12 h of incubation at 37°C, germination was investigated on 300 conidia per well and the percentage of germination was calculated. Results correspond to the mean of quadruplicate experiments which were repeated 3 times, always using freshly prepared conidia.

Statistical analysis

The minimum concentration of menadione or paraquat which induced a 75% decrease in the germination rate compared to control conditions without oxidant (75% germination inhibitory concentration or GIC_{75}), was determined for comparison between species or between clinical and environmental isolates.

Illustrations were prepared using Graphpad Prism and results were analyzed by Wilcoxon-Mann Whitney test. The results were considered as significantly different with p value < 0.05.

Results

Dose-dependent inhibition of germination by chemical oxidants

Conidia of the different *Scedosporium* isolates were incubated for 12 h at 37°C in the presence of increasing concentrations of menadione or paraquat, and the percentage of germination was then evaluated. Results showed a dose-dependent inhibition of germination under these oxidative stress conditions. Low concentrations of menadione has little effect on germination of the conidia, with usually less than 10% inhibition with concentrations up to 20 µmol/L **(Figure 1A, C, E, G and I)**. *Scedosporium* isolates were more susceptible to paraquat since incubation of the conidia with the lowest concentration tested resulted in a 10 to 60% inhibition of germination compared to the control **(Figure 1B, D, F, H and J)**. At high concentrations of menadione or paraquat, an almost complete inhibition of germination (less than 5% of germinated conidia after 12 h of incubation) was seen for most of the isolates studied. Some isolates were less susceptible to the drugs, with a maximum of 80% inhibition of germination at the highest concentration tested of menadione or paraquat. In all cases, subcultures from the wells showing almost complete inhibition of germination yielded the expected number of colonies, demonstrating viability of the conidia despite a 12-h exposure to the oxidants.

The minimum concentration of menadione or paraquat inhibiting 75% of the germination compared to the control (GIC_{75}) was determined for each isolate and each well. It was not possible to determine GIC_{75} for one of the isolates when exposed to paraquat, *S. dehoogii* UA 120008799, inhibition of germination never reaching 75% whatever the concentration of the compound.

Mean GIC_{75} values were determined for each isolate from the quadruplicate wells and the three set of experiments. Inter-wells variability did not exceed 5%, apart from four isolates which showed up to 6.5% variability with one of the oxidants. Likewise, in most cases, variability between the experiments did not exceed 5% (up to 8% variability was seen for 10 isolates with one of the oxidants tested).

We also investigated the influence of pH of the culture medium on germination. Compared to the control (YPD broth pH 7), no changes were seen in the germination rate for all isolates in a pH range of 5 to 9 (data not shown). Conidia of *S. aurantiacum* isolates were able to germinate on a larger pH range,

from pH 4 to 12, as well as conidia of *S. boydii* (pH 5 to 12), *S. minutisporum* (pH 5 to 11) and *S. dehoogii* (pH 5 to 10) (data not shown).

Interspecies variability in the germination rate under oxidative stress conditions

For comparison between species, mean GIC_{75} values were calculated for each species taking into account either all the isolates studied, or separately the clinical or environmental isolates. No significant differences were observed between species when mean GIC_{75} values were determined independently of the origin of the isolates. Conversely interspecies variability in the susceptibility to the oxidative stress was found when considering separately the clinical or the environmental isolates **(Figure 1)**. In the presence of menadione, clinical *S. aurantiacum* isolates were the less affected in conidial germination (GIC_{75}: 75.8 ± 9.1 µmol/L), followed in decreasing order of tolerance by clinical *S. boydii*, *S. minutisporum* and *S. apiospermum* isolates (Table 2). Regarding environmental isolates, *S. apiospermum* and *S. boydii* exhibited the highest tolerance to the oxidative stress (GIC_{75}: 88.1 ± 4.2 µmol/L and 75.5 ± 19.9 µmol/L, respectively), followed by *S. aurantiacum*, *S. dehoogii* and *S. minutisporum* isolates **(Table 2)**. Nevertheless, whereas significant differences were observed between all *Scedosporium* species regarding clinical isolates, significance was only seen between *S. minutisporum* and the other species as well as between *S. apiospermum* and *S. aurantiacum* for environmental isolates.

Great variations were also seen between *Scedosporium* species in conidial germination of clinical isolates upon exposure to paraquat. *Scedosporium minutisporum* clinical isolates exhibited the highest resistance to paraquat (GIC_{75}: 6.6 ± 0.1 mmol/L) while *S. dehoogii* was the less resistant to paraquat when comparing environmental isolates **(Table 3)**. Nevertheless, statistical analysis showed significance in a limited number of cases, and for instance upon exposure to paraquat, significant differences were only seen between *S. aurantiacum* and *S. apiospermum, S. dehoogii* or *S. minutisporum* for environmental isolates **(Table 3)**.

Clinical isolates are less able to germinate under oxidative stress conditions

Analysis of the results showed significant differences between clinical and environmental isolates for *S. apiospermum* and *S. aurantiacum* upon exposure of the conidia to menadione with a *p* value of 1.03×10^{-4} and 1.23×10^{-2}, respectively **(Figure 2A)**. For these two species, clinical isolates were more susceptible to menadione that environmental isolates and this was particularly true for *S. apiospermum*. No significant differences in the germination rate were observed between clinical and environmental isolates for *S. boydii* and *S. minutisporum* **(Figure 2 A)**.

Conidia of clinical *S. apiospermum, S. aurantiacum* or *S. boydii* isolates were more susceptible to paraquat than those of their environmental counterparts, with *p* values of 1.59×10^{-5}, 4.57×10^{-5} and 1.77×10^{-3}, respectively **(Figure 2B)**.

Discussion

Although not clearly demonstrated, colonization of the airways by *Scedosporium* species in CF patients is likely to occur through inhalation of some airborne conidia. Evasion of the inhaled conidia to the host immune response and their germination are crucial steps for the success of the colonization process. Therefore, we investigated here the germination capacity of the conidia of different clinical or environmental isolates belonging to the main *Scedosporium* species upon exposure to a chemical oxidative stress. Germination of the conidia was quantified in the presence of increasing concentrations of menadione which generates both intracellular and extracellular production of superoxide anions, or of paraquat which generates an intracellular production of superoxide only. Our results showed a dose-dependent inhibition of germination upon exposure to these compounds. Germination was only slightly affected at low concentration of the oxidants, particularly with menadione. In addition, our results showed the lack of significant differences in the germination rate of the conidia between the different *Scedosporium* species when clinical and environmental isolates are considered together. All species have the same susceptibility to superoxide anions. To survive in the environment, all *Scedosporium* species, including *S. dehoogii*, need to evade the numerous oxidative stresses they are exposed to. Interestingly, apart from *S. dehoogii*, all species tested are capable to chronically colonize the airways of patients with CF (Defontaine *et al.* 2002; Zouhair *et al.* 2013) and to do this, they also need to detoxify ROS produced by phagocytic cells. Nevertheless, *S. dehoogii* was shown to be the most virulent *Scedosporium* species in a murine model of disseminated scedosporiosis with intravenous inoculation of the conidia in the caudal vein (Gilgado *et al.* 2009). Whereas no differences in virulence were observed between *Scedosporium* species in immunosuppressed animals, *S. dehoogii* induced a significantly higher lethality in immunocompetent mice. In our experiments only the germination process was investigated since the germination rate was determined 12 hours after incubation with menadione or paraquat. Hyphal elongation was not considered nor the evasion of the hyphae to the host immune response, or their ability to acquire the extracellular iron. Here we showed that, among *Scedosporium* species, *S. dehoogii* isolates were the less tolerant to paraquat, but also with *S. minutisporum* the less tolerant species to menadione. Therefore, one may speculate that the inability of *S. dehoogii* to colonize the CF airways may be related to a particular susceptibility of its conidia to the oxidative stress, leading to the inhibition of their germination and therefore facilitating their phagocytosis by alveolar macrophages. Comparative genomic analysis should be conducted between *S. dehoogii* and CF-associated *Scedosporium* species searching for the lack in its genome of genes conferring protection to the conidia against the oxidative stress generated by phagocytic cells.

Conversely, statistical analyses revealed, at least with one of the chemicals used, significant differences between clinical and environmental isolates for the three major pathogenic species, that are *S. apiospermum* and *S. boydii* in Europe, and *S. aurantiacum* in Australia (Blyth *et al.* 2010b; Zouhair *et al.* 2013; Sedlacek *et al.* 2015). *Scedosporium* spp. are primarily soil saprophytes. Therefore, our results suggest an evolution of the fungal genome within the host. Adaptation of pathogens in the CF context is largely documented for bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa* with the evolution from a wild-type

phenotype to the mucoid or the small colony variant phenotypes (Cioufu *et al*. 2010; Malone *et al.* 2010). Likewise, chronic *P. aeruginosa* infection in CF involves genomic evolution with selection of virulence traits required for an acute infection (Smith *et al*. 2006; Mena *et al.* 2008; Hoboth *et al*. 2009). Nevertheless, adaptation of fungal pathogens with the ageing colonization of CF patients has never been described. In other clinical contexts, genetically altered variants (by single nucleotide polymorphisms or large-scale genomic rearrangements such as loss of heterozygosity and aneuploidies) that are better adapted to the host environment, are generated for *C. albicans* or *Cr. neoformans* within the host (Fries *et al*. 1996; Jain *et al*. 2005; Chow *et al*. 2012; Ford *et al*., 2015; Morschhäuser, 2016). Here we provide for the first time experimental data suggesting an adaptation of *Scedosporium* species to the CF lung microenvironment, which may have important consequences for patient management. One may speculate that, once established within the CF lung, the fungus embedded in the sticky viscous mucus or protected by the extracellular matrix when growing as biofilms, is less exposed to ROS (Zhang *et al.* 2010; Cáp *et al.* 2012). Therefore, during the long-term colonization of the airways, an adaptive microevolution could occur, leading to genetically adapted isolates with downregulation of ROS scavengers such as SODs and catalases for energy preservation and increased fitness. Further studies using a large number of environmental and clinical isolates, including sequential clinical isolates from early to chronic colonization of the airways, together with *in vitro* antifungal susceptibility testing and biochemical and genomic analysis, are needed to confirm this adaptation.

Recently, Mello *et al.* (2016) demonstrated that *S. aurantiacum* conidia germinate faster than those of *S. apiospermum.* Conidia of clinical *S. aurantiacum* isolates were also less sensitive to menadione than those of *S. apiospermum*. Likewise, although environmental *Scedosporium* isolates exhibited less interspecies variability than their clinical counterparts, a significant difference in tolerance of the conidia to menadione and paraquat was also seen between *S. aurantiacum* and *S. apiospermum*. Interestingly, amongst *Scedosporium* species, *S. aurantiacum* was also showed to be the most resistant to antifungals (Gilgado *et al.* 2006; Lackner *et al.* 2012), suggesting a link between antifungal resistance and tolerance to oxidative stress. Such link has been suggested in other fungal pathogens like *C. albicans* regarding resistance to miconazole or amphotericin B and SOD synthesis or activity (Bink *et al.* 2011; De Bruker *et al*. 2013; De Cremer *et al.* 2016) or *A. terreus* regarding resistance to amphotericin B and an increased synthesis of catalases (Blum *et al.* 2008). Finally, another interesting information derived from our experiments is that conidia of all *Scedosporium* species were able to germinate in a large pH range, between pH 5 to pH 9, thus confirming previous results from Mello *et al.* (2016).

Conclusion

In conclusion, the link between germination and pathogenesis is largely documented today, hyphal forms being more resistant than conidia to phagocytosis or killing by antimicrobial peptides and associated to spreading and invasion of the host tissues. Therefore, the differences reported here between the major *Scedosporium* species or between clinical and environmental isolates in the ability of their conidia to

germinate under oxidative stress conditions may partly explain the differences in their prevalence and virulence.

Acknowledgements

C.S. was recipient, for her PhD thesis, of a grant from the French patient organization against cystic fibrosis, Vaincre La Mucoviscidose, which is gratefully acknowledged [RF20140501104].

References

Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, Rodriguez-Tudela JL (2007) Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates. Antimicrob Agents Chemother 51:748–751. doi: 10.1128/AAC.01177-06

Balandin B, Aguilar M, Sánchez I, Monzón A, Rivera I, Salas C, Valdivia M, Alcántara S, Pérez A, Ussetti P (2016) *Scedosporium apiospermum* and *S. prolificans* mixed disseminated infection in a lung transplant recipient: An unusual case of long-term survival with combined systemic and local antifungal therapy in intensive care unit. Med Mycol Case Rep 11:53–56. doi: 10.1016/j.mmcr.2016.04.006

Bink A, Vandenbosch D, Coenye T, Nelis H, Cammue BP, Thevissen K (2011) Superoxide dismutases are involved in *Candida albicans* biofilm persistence against miconazole. Antimicrob Agents Chemother 55:4033–4037. doi: 10.1128/AAC.00280-11

Blum G, Perkhofer S, Haas H, Schrettl M, Würzner R, Dierich MP, Lass-Flörl C (2008) Potential basis for amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. Antimicrob Agents Chemother 52:1553–1555. doi: 10.1128/AAC.01280-07

Blyth C, Harun A, Middleton PG, Sleiman S, Lee O, Sorrell TC, Meyer W, Chen SCA (2010a) Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. J Clin Microbiol 48:314–316. doi: 10.1128/JCM.01470-09

Blyth C, Middleton P, Harun A, Sorrell T, Meyer W, Chen S (2010b) Clinical associations and prevalence of *Scedosporium spp.* in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? Med Mycol 48 Suppl 1:S37–44. doi: 10.3109/13693786.2010.500627

Bouchara JP, Horré R, de Hoog S (2009) *Pseudallescheria* and *Scedosporium*: emerging opportunists. Med Mycol 47:341–342. doi: 10.1080/13693780902756974

Cáp M, Váchová L, Palková Z (2012) Reactive oxygen species in the signaling and adaptation of multicellular microbial communities. Oxid Med Cell Longev 2012:976753. doi: 10.1155/2012/976753

van Burik JA, Magee PT (2001) Aspects of fungal pathogenesis in humans. Annu Rev Microbiol 55:743–772. doi: 10.1146/annurev.micro.55.1.743

Chow EW, Morrow CA, Djordjevic JT, Wood IA, Fraser JA (2012) Microevolution of *Cryptococcus neoformans* driven by massive tandem gene amplification. Mol Biol Evol 29:1987–2000. doi: 10.1093/molbev/mss066.

Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP (2000) Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 19:53–56. doi: 10.1007/s100960050011

Ciofu O, Mandsberg LF, Bjarnsholt T, Wassermann T, Høiby N (2010) Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* during chronic lung infection of patients with cystic fibrosis: strong and weak mutators with heterogeneous genetic backgrounds emerge in mucA and/or lasR mutants. Microbiology 156:1108–1119. doi: 10.1099/mic.0.033993-0

Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, Rinaldi MG, Shea YR, Zaoutis T, Kottilil S, Walsh TJ (2008) Infections caused by *Scedosporium spp*. Clin Microbiol Rev 21:157–197. doi: 10.1128/CMR.00039-07

De Brucker K, Bink A, Meert E, Cammue BP, Thevissen K (2013) Potentiation of antibiofilm activity of amphotericin B by superoxide dismutase inhibition. Oxid Med Cell Longev 2013:704654. doi: 10.1155/2013/704654

De Cremer K, De Brucker K, Staes I, Peeters A, Van den Driessche F, Coenye T, Cammue BP, Thevissen K (2016) Stimulation of superoxide production increases fungicidal action of miconazole against *Candida albicans* biofilms. Sci Rep 6:27463. doi: 10.1038/srep27463

Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, Diouri M, Hallet J-N, Bouchara J-P (2002) Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 40:2108–2114. doi: 10.1128/JCM.40.6.2108-2114.2002

Fang FC (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. Nature Rev Microbiol 2:820–832. doi: 10.1038/nrmicro1004

Ford C, Funt J, Abbay D, Issi L, Guiducci C, Martinez D, Delorey T, Li BY, White T, Cuomo C, Rao R, Berman J, Thompson D, Regev A (2015) The evolution of drug resistance in clinical isolates of *Candida albicans*. eLife 4:e00662. doi: 10.7554/eLife.00662.

Fries BC, Chen FY, Currie BP, Casadevall A (1996) Karyotype instability in *Cryptococcus neoformans* infection. J Clin Microbiol 34:1531–1534

Gessler NN, Aver'yanov AA, Belozerskaya TA (2007) Reactive oxygen species in regulation of fungal development. Biochemistry (Mosc) 72:1091–1109. doi: 10.1134/S0006297907100070

Ghamrawi S, Gastebois A, Zykwinska A, Vandeputte P, Marot A, Mabilleau G, Cuénot S, Bouchara JP (2015) A multifaceted study of *Scedosporium boydii* cell wall changes during germination and identification of GPI-anchored proteins. PLoS One 10(6):e0128680. doi: 10.1371/journal.pone.0128680

Gilgado F, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J (2009) Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Med Mycol 47:371–374. doi: 10.1080/13693780802256539

Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J (2006) Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Antimicrob Agents Chemother 50:4211–4213. doi: 10.1128/AAC.00981-06

Gow NAR, Brown AJP, Odds FC (2002) Fungal morphogenesis and host invasion. Curr Opin Microbiol 5:366–371. doi: 10.1016/S1369-5274(02)00338-7

Griffiths HR, Mistry P, Herbert KE, Lunec J (1998) Molecular and cellular effects of ultraviolet light-induced genotoxicity. Crit Rev Clin Lab Sci 35:189–237. doi: 10.1080/10408369891234192

Guarro J, Kantarcioglu AS, Horré R, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, de Hoog GS (2006) *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. Med Mycol 44:295–327. doi: 10.1080/13693780600752507

Heller J, Tudzynski P (2011) Reactive oxygen species in phytopathogenic fungi: signaling, development, and disease. Annu Rev Phytopathol 49:369–390. doi: 10.1146/annurev-phyto-072910-095355

Hoboth C, Hoffmann R, Eichner A, Henke C, Schmoldt S, Imhof A, Heesemann J, Hogardt M (2009) Dynamics of adaptive microevolution of hypermutable *Pseudomonas aeruginosa* during chronic pulmonary infection in patients with cystic fibrosis. J Infect Dis 200:118–130. doi: 10.1086/599360

Horré R, Marklein G (2009) Isolation and clinical significance of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species. Med Mycol 47:415–421. doi: 10.1080/13693780902801259

Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Nidermajer S, Reiffert SM (2009) Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients. Respiration 77:320–324. doi.org/10.1159/000167419

Jain N, Wickes BL, Keller SM, Fu J, Casadevall A, Jain P, Ragan MA, Banerjee U, Fries BC (2005) Molecular epidemiology of clinical *Cryptococcus neoformans* strains from India. J Clin Microbiol 43:5733–5742. doi: 10.1128/JCM.43.11.5733-5742.2005

Jakubowski W, Biliński T, Bartosz G (2000) Oxidative stress during aging of stationary cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Free Rad Biol Med 28:659–664. doi: 10.1016/S0891-5849(99)00266-X

Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, Meis JF (2012) Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. Antimicrob Agents Chemother 56:2635–2642. doi: 10.1128/AAC.05910-11

Malone JG, Jaeger T, Spangler C, Ritz D, Spang A, Arrieumerlou C, Kaever V, Landmann R, Jenal U (2010) YfiBNR mediates cyclic di-GMP dependent small colony variant formation and persistence in *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS Pathog 6(3):e1000804. doi: 10.1371/journal.ppat.1000804

Mello TP de, Aor AC, Oliveira SS de, Branquinha MH, dos Santos ALS (2016) Conidial germination in *Scedosporium apiospermum, S. aurantiacum, S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*: influence of growth conditions and antifungal susceptibility profiles. Mem Inst Oswaldo Cruz 0: 0. doi: 10.1590/0074-02760160200

Mena A, Smith EE, Burns JL, Speert DP, Moskowitz SM, Perez JL, Oliver A (2008) Genetic adaptation of *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients is catalyzed by hypermutation. J Bacteriol 190:7910-7917. doi: 10.1128/JB.01147-08

Morschhäuser J (2016) The development of fluconazole resistance in *Candida albicans* - an example of microevolution of a fungal pathogen. J Microbiol 54:192–201. doi: 10.1007/s12275-016-5628-4

Nathan C, Cunningham-Bussel A (2013) Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. Nat Rev Immunol 13:349–361. doi: 10.1038/nri3423

Nathan C, Shiloh MU (2000) Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. Proc Natl Acad Sci U S A 97:8841–8848. doi: 10.1073/pnas.97.16.8841

Osherov N, May GS (2001) The molecular mechanisms of conidial germination. FEMS Microbiol Lett 199:153–160. doi: 10.1111/j.1574-6968.2001.tb10667.x

Parize P, Boussaud V, Poinsignon V, Sitterlé E, Botterel F, Lefeuvre S, Guillemain R, Dannaoui E, Billaud EM (2017) Clinical outcome of cystic fibrosis patients colonized by *Scedosporium* species following lung transplantation: A single-center 15-year experience. Transpl Infect Dis Jun 15. doi: 10.1111/tid.12738

Peghin M, Monforte V, Martin-Gomez MT, Ruiz-Camps I, Berastegui C, Saez B, Riera J, Solé J, Gavaldá J, Roman A (2016) Epidemiology of invasive respiratory disease caused by emerging non-*Aspergillus* molds in lung transplant recipients. Transplant Infect Dis 18:70–78. doi: 10.1111/tid.12492

Pihet M, Carrère J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, Bouchara J-P, (2008) Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis – a review. Med Mycol 47:387–397. doi: 10.1080/13693780802609604

Renwick J, Daly P, Reeves EP, Kavanagh K (2006) Susceptibility of larvae of *Galleria mellonella* to infection by *Aspergillus fumigatus* is dependent upon stage of conidial germination. Mycopathologia 161:377–384. doi: 10.1007/s11046-006-0021-1

Rougeron A, Giraud S, Alastruey-Izquierdo A, Cano J, Rainer J, Mouhajir M, Le Gal S, Nevez G, Meyer W, Bouchara JP (2017) Ecology of *Scedosporium* species: present knowledge and future research. Mycopathologia.

Schaffner A, Douglas H, Braude A (1982) Selective protection against conidia by mononuclear and against mycelia by polymorphonuclear phagocytes in resistance to *Aspergillus*. Observations on these two lines of defense *in vivo* and *in vitro* with human and mouse phagocytes. J Clin Invest 69:617–631

Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, Albert F, Peter S, Würstl B, Wagner S, Klotz M, Becker A, Haase G, Laniado G, Kahl B, Suerbaum S, Seibold M, Tintelnot K (2015) Prevalence of *Scedosporium species* and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. J Cyst Fibros 14:237–241. doi: 10.1016/j.jcf.2014.12.014

Sitterlé E, Giraud S, Leto J, Bouchara JP, Rougeron A, Morio F, Dauphin B, Angebault C, Quesne G, Beretti JL, Hassouni N, Nassif X, Bougnoux ME (2014) Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/Scedosporium* species. Clin Microbiol Infect 20:929–935. doi: 10.1111/1469-0691.12574

Smith EE, Buckley DG, Wu Z, Saenphimmachak C, Hoffman LR, D'Argenio DA, Miller SI, Ramsey BW, Speert DP, Moskowitz SM, Burns JL, Kaul R, Olson MV (2006) Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci USA 103:8487–8492. doi: 10.1073/pnas.0602138103

Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, Calenda A, Larcher G, Gillmann L, Papon N, Bouchara J-P, Fleury MJJ (2017a) Microbial antioxidant defense enzymes. Microb Pathog 110:56–75. doi: 10.1016/j.micpath.2017.06.015

Staerck C, Vandeputte P, Gastebois A, Calenda A, Giraud S, Papon N, Bouchara JP, Fleury MJJ (2017b) Enzymatic mechanisms involved in evasion of fungi to the oxidative stress: Focus on *Scedosporium apiospermum*. Mycopathologia Jun 21. doi: 10.1007/s11046-017-0160-6

Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, Denis O, Estenne M, Nolard N, Jacobs F (2006) Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. J Heart Lung Transplant 25:603–607. doi: 10.1016/j.healun.2005.12.011

Ramirez-Garcia A, Pellon A, Rementeria A, Buldain I, Barreto-Berguer E, Rollin-Pinheiro R, Vieira de Meirelles J, XIsto MI, Ranque S, Havlicek V, Vandeputte P, Le Govic Y, Bouchara JP, Giraud S, Chen S, Rainer J, Alastruey-Izquierdo A, Martin-Gomez MT, López-Soria LM, Peman J, Schwarz C, Bernhard A, Tintelnot K, Capilla J, Martin Vicente A, Cano-Lira J, Nagl M, Lackner M, Irinyi L, Meyer W, de Hoog S, Hernando FL, (2017). *Scedosporium* complex and *Lomentospora prolificans*: an updated overview of underrated opportunist. Medical Mycology.

Thomson S, Alibhai K, Winkelaar G, Lien D, Halloran K, Kapasi A, Weinkauf J (2015) Case report of vertebral osteomyelitis and mycotic abdominal aortic aneurysm caused by *Scedosporium apiospermum* in a lung transplant patient with cystic fibrosis. Transplant Proc 47:204–209. doi: 10.1016/j.transproceed.2014.07.072

Waldorf AR (1989) Pulmonary defense mechanisms against opportunistic fungal pathogens. Immunol Ser 47:243–271

Zhang Y, Li X, Grassmé H, Döring G, Gulbins E (2010) Alterations in ceramide concentration and pH determine the release of reactive oxygen species by Cftr-deficient macrophages on infection. J Immunol 184:5104–5111. doi: 10.4049/jimmunol.0902851

Ziesing S, Suerbaum S, Sedlacek L (2016) Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. Med Mycol 54:781–786. doi.org/10.1093/mmy/myw035

Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara J-P, Giraud S (2013) Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. Med Mycol 51:603–613. doi: 10.3109/13693786.2013.770606

Table 1: *Scedosporium* isolates used in this study.

Species and isolate number	Isolation date	Geographic location	Underlying disease or sampling site
S. apiospermum			
IHEM 14268	1998	Giens (France)	Sputum from CF patient
IHEM 14462	1995	Tours (France)	Sputum from CF patient
IHEM 23580	2008	Toulouse (France)	Sputum from CF patient
UA120217796/2	2013	Meknes (Morocco)	Soil from plant nursery
UA120218482/4	2013	Meknes (Morocco)	Garbage dump
S. aurantiacum			
IHEM 23578	2008	Tours (France)	Sputum from CF patient
707 660	2007	Rouen (France)	Sputum from CF patient
UA110349103-01/1	2011	Angers (France)	Sand from Loire riverbank
UA110349103-01/3	2011	Angers (France)	Sand from Loire riverbank
UA120008824-01/1	2007	Angers (France)	Waste water treatment plant
S. boydii			
IHEM 15555	1998	Tours (France)	Sputum from CF patient
IHEM 23574	2007	Angers (France)	Sputum from CF patient
IHEM 23837	2008	Angers (France)	Sputum from CF patient
UA120217796/1	2013	Meknes (Morocco)	Soil from plant nursery
UA120218478/1	2013	Meknes (Morocco)	Garbage dump
S. dehoogii			
UA110354521-01/2	2007	Meknes (Morocco)	Soil from rape field
UA110350905-01/1	2011	Angers (France)	Soil from a cowshed
UA110354504-01/1	2011	Angers (France)	Soil from a fallow land
UA120008799-01/1	2011	Angers (France)	Waste water treatment plant
S. minutisporum			
IHEM 23833	2003	Angers (France)	Sputum from CF patient
UA110350824-01/3	2011	Angers (France)	Electrical transformer station

IHEM: Institute of Hygiene and Epidemiology – Mycology section (Scientific Institute of Public Health, Brussels, Belgium); UA: University of Angers (Angers, France).

Table 2: Influence of menadione on germination of the conidia of clinical or environmental *Scedosporium* isolates.

	GIC_{75}	*p* value				
	(µmol/L)	*S. apiospermum*	*S. aurantiacum*	S. *boydii*	*S. dehoogii*	*S. minutisporum*
Clinical isolates						
S. apiospermum (n = 3)	22.5 ± 9.7	/	**1×10^{-4}**	**3×10^{-6}**	ND	**7×10^{-3}**
S. aurantiacum (n = 2)	75.8 ± 9.1	**1×10^{-4}**	/	**4×10^{-5}**	ND	**2×10^{-2}**
S. *boydii* (n = 3)	69.1 ± 14.0	**3×10^{-6}**	**4×10^{-5}**	/	ND	**4×10^{-3}**
S. minutisporum (n = 1)	53.9 ± 3.8	**7×10^{-3}**	**2×10^{-2}**	**4×10^{-3}**	ND	/
Environmental isolates						
S. apiospermum (n = 2)	88.1 ± 4.2	/	**4×10^{-5}**	7×10^{-1}	5×10^{-2}	**2×10^{-2}**
S. aurantiacum (n = 3)	66.0 ± 9.5	**4×10^{-5}**	/	5×10^{-1}	3×10^{-1}	**3×10^{-2}**
S. *boydii* (n = 2)	75.5 ± 19.9	7×10^{-1}	5×10^{-1}	/	9×10^{-2}	**1×10^{-2}**
S. dehoogii (n = 4)	62.7 ± 19.8	5×10^{-2}	3×10^{-1}	9×10^{-2}	/	7×10^{-1}
S. minutisporum (n = 1)	53.3 ± 2.0	**2×10^{-2}**	**3×10^{-2}**	**1×10^{-2}**	7×10^{-1}	/

Data correspond to mean 75% inhibitory concentrations and *p* values obtained with Wilcoxon-Mann Whitney test. *P* values < 0.05 (indicated in bold face) were considered as significant. ND, comparison not done due to the lack of clinical isolates for *S. dehoogii.*

Table 3: Influence of paraquat on germination of the conidia of clinical or environmental *Scedosporium* isolates.

	GIC_{75}	*p* value				
	(mmol/L)	*S. apiospermum*	*S. aurantiacum*	S. *boydii*	*S. dehoogii*	*S. minutisporum*
Clinical isolates						
S. apiospermum (n = 3)	2.1 ± 2.1	/	5×10^{-1}	2×10^{-1}	ND	**1×10^{-3}**
S. aurantiacum (n = 2)	5.8 ± 0.5	5×10^{-1}	/	**2×10^{-4}**	ND	**3×10^{-3}**
S. *boydii* (n = 3)	3.5 ± 1.1	2×10^{-1}	**2×10^{-4}**	/	ND	**4×10^{-3}**
S. minutisporum (n = 1)	6.6 ± 0.1	**1×10^{-3}**	**3×10^{-3}**	**4×10^{-3}**	ND	/
Environmental isolates						
S. apiospermum (n = 2)	6.7 ± 0.6	/	**1×10^{-4}**	1	6×10^{-1}	9×10^{-1}
S. aurantiacum (n = 3)	8.2 ± 0.7	**1×10^{-4}**	/	9×10^{-1}	**1×10^{-3}**	**2×10^{-3}**
S. *boydii* (n = 2)	7.0 ± 2.7	1	9×10^{-1}	/	3×10^{-1}	1
S. dehoogii (n = 3)	6.0 ± 1.4	6×10^{-1}	**1×10^{-3}**	3×10^{-1}	/	6×10^{-1}
S. minutisporum (n = 1)	6.7 ± 0.1	9×10^{-1}	**2×10^{-3}**	1	6×10^{-1}	/

Data correspond to mean 75% inhibitory concentrations and *P* values obtained with Wilcoxon-Mann Whitney test. *P* values < 0.05 (indicated in bold face) were considered as significant. ND, comparison not done due to the lack of clinical isolates for *S. dehoogii.*

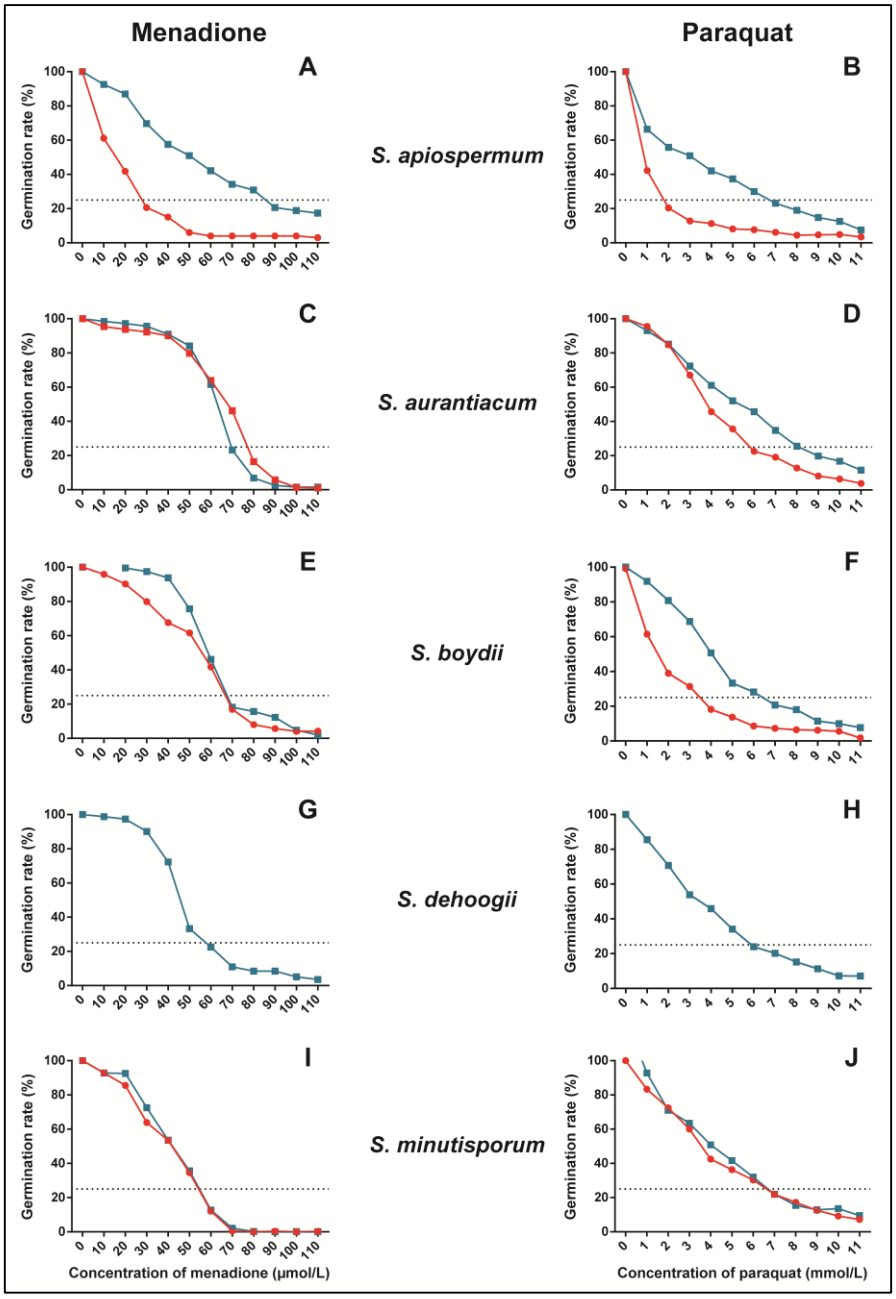


Figure 1: Inhibition of germination of *Scedosporium* isolates in the presence of menadione (A, C, E, G, I) or paraquat (B, D, F, H, J).

Germination of the conidia of *S. apiospermum* (**A** and **B**), *S. aurantiacum* (**C** and **D**), *S. boydii* (**E** and **F**), *S. dehoogii* (**G** and **H**) and *S. minutisporum* (**I** and **J**) was investigated in the presence of increasing concentrations of menadione or paraquat. In red is presented the mean percentage of germination obtained for clinical isolates, and in blue for environmental isolates. The dashed lines represent the minimum concentration of menadione or paraquat inhibiting 75% of the germination (GIC_{75}).

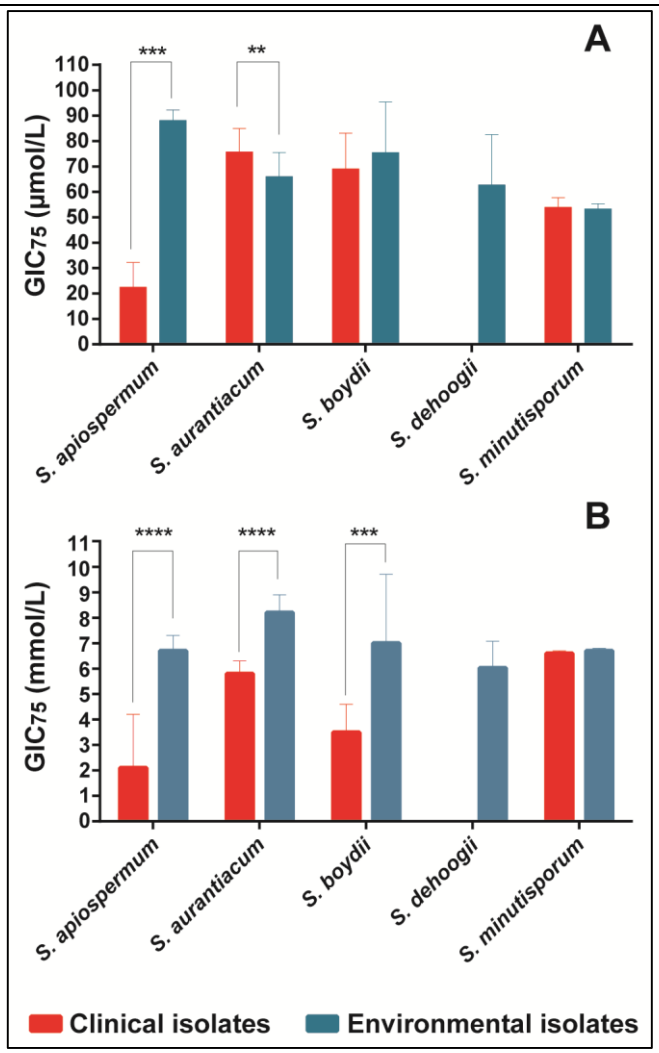


Figure 2: Comparison of GIC_{75} values between clinical and environmental *Scedosporium* isolates in the presence of menadione (A) or paraquat (B).

GIC_{75} (minimum concentration resulting in a 75% decrease in germination rate) values are presented in red for clinical isolates, and in blue for environmental isolates. *P* values were obtained with Wilcoxon-Mann Whitney test. * *p* value < 0.05; ** 0.01 < *p* value < 0,05; *** 0.001 < *p* value < 0.01; **** *p* value < 0.001.

2. Etude de l'expression de la catalase A1 et de la Cu/Zn superoxyde dismutase de *S. boydii* en condition de stress oxydatif

Identification of *Scedosporium boydii* catalase A1 gene, a reactive oxygen species detoxification factor highly expressed in response to oxidative stress and phagocytic cells.

Sara Mina[1], Cindy Staerck[1], Senan d'Almeida[2], Agnès Marot[1], Yves Delneste[3], Alphonse Calenda[1], Julie Tabiasco[2], Jean-Philippe Bouchara[4], Maxime Fleury[5]

[1] L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES EA 3142, Angers, France.

[2] L'UNAM Université, Université d'Angers, Immunité Innée et Immunothérapie, Angers, France; Inserm UMR 892, Angers, France; CNRS UMR 6299, Angers, France.

[3] L'UNAM Université, Université d'Angers, Immunité Innée et Immunothérapie, Angers, France; Inserm UMR 892, Angers, France; CNRS UMR 6299, Angers, France; Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, France.

[4] L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES EA 3142, Angers, France; Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, France.

[5] L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES EA 3142, Angers, France.

Publié dans Fungal Biology, le 24 septembre 2015.

Résumé

Scedosporium boydii est un champignon filamenteux opportuniste, qui peut être responsable d'infections survenant chez l'immunodéprimé comme chez des individus immunocompétents. Ce champignon, très proche morphologiquement de *S. apiospermum*, appartient au genre *Scedosporium*, qui se situe au deuxième rang parmi les champignons filamenteux colonisant de manière chronique les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, ce qui suggère l'existence chez ces champignons de mécanismes pathogéniques leur permettant de se développer dans les voies respiratoires. Peu de facteurs potentiels de virulence ont été purifiés et caractérisés chez les espèces du genre *Scedosporium*, à savoir une sérine protéase de type subtilisine, une superoxyde dismutase (SOD) cytosolique à Cu/Zn (SodC) et une catalase monofonctionnelle (catalase A1). Lors d'une infection microbienne, les cellules phagocytaires de l'hôte libèrent des espèces oxygénées réactives, comme le peroxyde d'hydrogène, qui participent à la réponse antimicrobienne. Les catalases sont connues pour protéger les pathogènes contre les ROS en dégradant le peroxyde d'hydrogène. Ici, nous avons identifié chez *S. boydii*, le gène codant la catalase A1 (*CATA1)* et étudié son expression en réponse aux conditions environnementales rencontrées par le champignon dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, ou lors d'un stress oxydatif. Ces expériences ont montré que l'expression du gène *CATA1* était peu affectée par l'hypoxie et l'hypercapnie ou à pH légèrement acide. Ce gène est par contre surexprimé en condition de stress oxydatif chimique avec une expression relative multipliée par 37, 20 et 5 en présence d'H_2O_2 250 µM, de ménadione 250 µM ou de paraquat 2 mM. De plus, le gène *CATA1* est progressivement surexprimé en co-culture avec des macrophages THP-1 activés, avec une surexpression de 26 fois après 12 h de co-culture. Les neutrophiles HL60 activés et les neutrophiles circulants activés induisent une expression plus rapide du gène *CATA1* de *S. boydii*, avec respectivement un maximum de surexpression obtenu après 75 min (x 17) et 60 min (x 15) de co-culture. Inversement, l'expression du gène *SODC* n'est pas affectée par le peroxyde d'hydrogène, la ménadione et le paraquat, comme en co-culture avec des cellules phagocytaires. Ces résultats suggèrent que le gène *CATA1* est fortement stimulé lors d'un stress oxydant alors que le gène *SODC* serait constitutivement exprimé.

Mots-clés : catalase, mucoviscidose, phagocytes, ROS, *Scedosporium boydii,* SodC

FUNGAL BIOLOGY 119 (2015) 1322–1333

ELSEVIER

British Mycological Society promoting fungal science

journal homepage: www.elsevier.com/locate/funbio

Identification of *Scedosporium boydii* catalase A1 gene, a reactive oxygen species detoxification factor highly expressed in response to oxidative stress and phagocytic cells☆

Sara MINA[a], *Cindy STAERCK*[a,1], *Sènan M. D'ALMEIDA*[b,c,d,1], *Agnès MAROT*[a], *Yves DELNESTE*[b,c,d,e], *Alphonse CALENDA*[a], *Julie TABIASCO*[b,c,d], *Jean-Philippe BOUCHARA*[a,f], *Maxime J. J. FLEURY*[a,*]

[a]*L'UNAM Université, Université d'Angers, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES EA 3142, Angers, France*
[b]*L'UNAM Université, Université d'Angers, Immunité Innée et Immunothérapie, Angers, France*
[c]*Inserm UMR 892, Angers, France*
[d]*CNRS UMR 6299, Angers, France*
[e]*Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, France*
[f]*Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, France*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 May 2015
Received in revised form
10 September 2015
Accepted 24 September 2015
Available online 9 October 2015
Corresponding Editor:
Simon Avery

Keywords:
Catalase
Cystic fibrosis
Phagocytes
ROS
Scedosporium apiospermum complex
SOD

ABSTRACT

Scedosporium boydii is an opportunistic filamentous fungus which may be responsible for a large variety of infections in both immunocompetent and immunocompromised individuals. This fungus belongs to the *Scedosporium apiospermum* species complex which usually ranks second among the filamentous fungi colonizing the airways of patients with cystic fibrosis (CF). Species of the *S. apiospermum* complex are able to chronically colonize the CF airways suggesting pathogenic mechanisms allowing persistence and growth of these fungi in the respiratory tract. Few putative virulence factors have been purified and characterized so far in the *S. apiospermum* complex including a cytosolic Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD) and a monofunctional catalase (catalase A1). Upon microbial infection, host phagocytes release reactive oxygen species (ROS), such as hydrogen peroxide, as part of the antimicrobial response. Catalases are known to protect pathogens against ROS by degradation of the hydrogen peroxide. Here, we identified the *S. boydii* catalase A1 gene (*CATA1*) and investigated its expression in response to the environmental conditions encountered in the CF airways and to the oxidative stress. Results showed that *S. boydii CATA1* gene expression is not affected by hypoxia, hypercapnia or pH changes. In contrast, *CATA1* gene was overexpressed in response to a chemically induced oxidative stress with a relative gene expression 37-fold higher in the presence of 250 μM H_2O_2, 20-fold higher with 250 μM menadione and 5-fold higher with 2 mM paraquat. Moreover, *S. boydii CATA1*

☆ A.M., A.C., J.P.B., and M.J.J.F. are members of the ECMM/ISHAM (European Confederation of Medical Mycology/International Society for Human and Animal Mycology) working group *Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis (Fri-CF)*.

* *Corresponding author*. Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, UPRES-EA 3142, Institut de Biologie en Santé-IRIS, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. Tel.: +33 (0)2 44 68 83 68.
E-mail address: maxime.fleury@univ-angers.fr (M. J. J. Fleury).

[1] Contributed equally to this work.

http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.007

1878-6146/© 2015 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

gene expression progressively increased upon exposure to activated THP-1-derived macrophages, reaching a maximum after 12 h (26 fold). Activated HL60-derived neutrophils and activated human peripheral blood neutrophils more rapidly induced *S. boydii CATA1* gene overexpression, a maximum gene expression level being reached at 75 min (17 fold) and 60 min (15 fold), respectively. In contrast expression of the gene encoding the Cu,Zn-SOD (*SODC* gene) was not affected by H_2O_2, menadione, paraquat or in co-culture with phagocytic cells. These results suggest that *S. boydii CATA1* gene is highly stimulated by the oxidative burst response whereas *SODC* gene is constitutively expressed.

© 2015 The British Mycological Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Scedosporium boydii is a filamentous fungus belonging to the *Scedosporium apiospermum* species complex which comprises four other species, namely *S. apiospermum sensu stricto*, *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium minutisporum*, and *Scedosporium dehoogii* (Gilgado *et al.* 2005; Gilgado *et al.* 2008; Lackner *et al.* 2014). All these fungi are ubiquitous saprophytic moulds commonly isolated from rural soils, sewage, polluted waters, composts, and from manure of cattle and fowl. Nevertheless they may be responsible for a large variety of infections in both immunocompetent and immunocompromised individuals, the most common pathogens in this species complex being *S. boydii* and *S. apiospermum*. Scedosporiosis usually consist in a large variety of infections, ranging from localized infections resulting from traumatic inoculation of some fungal elements to severe disseminated infections with central nervous involvement (Husain *et al.* 2005; Guarro *et al.* 2006; Katragkou *et al.* 2007) depending on the immunological status of the patients.

In cystic fibrosis (CF) patients, the respiratory tract is frequently colonized by various microorganisms, especially bacteria, but also fungi. The *S. apiospermum* complex ranks second among the filamentous fungi colonizing the airways of patients with CF after *Aspergillus fumigatus* (Pihet *et al.* 2009), with a prevalence ranging from 4.5 to 11.6 % (Defontaine *et al.* 2002; Katragkou *et al.* 2007; Horré & Marklein 2009; Horré *et al.* 2009; Borman *et al.* 2010; Masoud-Landgraf *et al.* 2014). Although usually asymptomatic, this fungal colonization may sometimes lead to bronchitis or allergic bronchopulmonary mycosis (Cimon *et al.* 2000; Vázquez-Tsuji *et al.* 2006). Moreover, several cases of severe and often fatal disseminated infections have been reported in CF patients undergoing lung transplantation (Castiglioni *et al.* 2002; Symoens *et al.* 2006; Sahi *et al.* 2007; Morio *et al.* 2010). These fungi are capable to chronically colonize the CF airways (Borghi *et al.* 2010; Zouhair *et al.* 2013) suggesting pathogenic mechanisms allowing them to grow and multiply in the respiratory tract. Nevertheless, very few biochemical studies, focused on polysaccharides (α-glucans, rhamnomannans, and peptidorhamnomannans [PRMs]) (Santos *et al.* 2009), glycolipids (glucosylceramides) (Pinto *et al.* 2002), and siderophores (Bertrand *et al.* 2009), have been performed so far regarding species of the *S. apiospermum* complex. In addition, hydrolytic enzymes thought to be involved in the host tissue invasion by the degradation of host protein barriers such as serine proteases (Larcher *et al.* 1996), metalloproteases (Pereira *et al.* 2009; Silva *et al.* 2011), and phosphatases (Kiffer-Moreira *et al.* 2007) have been identified, as well as enzymes possibly involved in evading the host oxidative response such as a cytosolic Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD) (Lima *et al.* 2007). In addition, we showed recently that *S. boydii* produces three distinct catalases and one of these enzymes called catalase A1 (Cat A1) was purified and characterized (Mina *et al.* 2015). Nevertheless, only three genes encoding putative virulence factors had been sequenced, *i.e.* the Cu,Zn-SOD gene (*SODC* gene) (Lima *et al.* 2007) and two genes encoding enzymes involved in the dihydroxynaphthalene-melanin synthesis pathway (Ghamrawi *et al.* 2014).

Establishment of a fungal infection depends on the capacity of the fungus to evade recognition and killing by the host immune system, particularly the oxidative response of phagocytes, since macrophages and neutrophils release antimicrobial compounds, especially reactive oxygen species (ROS). Classically, phagocytes secrete superoxide anions (O_2^-), which can undergo spontaneous dismutation in a pH- and concentration-dependent reaction yielding hydrogen peroxide (H_2O_2) or which are cleaved by leukocytes SODs in H_2O_2. Nevertheless, pathogens can evade the high levels of ROS produced during the oxidative burst response by the induction of several genes implicated in the maintenance of the cellular redox environment (Crawford & Davies 1994).

As species of the *S. apiospermum* complex can chronically colonize the CF lungs without being killed by ROS producing cells, they would have defense systems that counteract the deleterious effects of ROS. We report here the identification of *S. boydii* catalase A1 (*CATA1*) gene and the modulation of the genes of the two biochemically identified putative virulence factors that could be implicated in evading the oxidative burst response, catalase A1 and the Cu,Zn-SOD.

Materials and methods

Fungal strain and growth conditions

Scedosporium boydii IHEM 15155 originally isolated from human sputum in Angers University Hospital (France) was used throughout this study (Ghamrawi *et al.* 2014; Mina *et al.* 2015). This strain was maintained by weekly passages on homemade yeast extract-peptone-dextrose-agar (YPDA) medium (containing in g L^{-1}: yeast extract, 5; peptone, 10;

glucose, 20; and agar, 20) supplemented with chloramphenicol 0.5 %.

Conidia and mycelium first cultivated on YPDA chloramphenicol 0.5 % plates at 37 °C for 9 d were harvested by scraping the agar plates with sterile distilled water and filtered through 20-μm pore size nylon membranes. Conidia (6×10^7) were inoculated in YPD chloramphenicol 0.5 % broth (30 mL) in Petri dishes which were incubated at 37 °C without shaking for 24 h–96 h to obtain hyphae.

Catalase A1 gene sequencing

Intact genomic DNA was obtained by the method of Moller *et al.* (Möller *et al.* 1992) slightly modified as previously described (Ghamrawi *et al.* 2014).

To amplify an internal fragment of catalase A1 gene (CATA1) by PCR, degenerate primers were designed from sequence alignment of genes encoding catalases in four taxonomically related fungal species (Table 1). Accession numbers of the sequences used in the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih/gov/genbank/) were: *Colletotrichum orbiculare* (KB726076), *Myceliophthora thermophila* (XM_003662984), *Colletotrichum gloeosporioides* (AMYD01001794), and *Metarhizium acridum* (GL698492).

Table 1 – Primers used in this study.

Primer	Sequence 5'→ 3'
Catalase A1 gene sequencing	
CATd F1	GGMAACAACATYCCMGTC
CATd R1	GTCTCGGCAAAGTAGTTG
CATd F2	TGGAAGACBCTCCAGGGCAAG
CATd R2	CGGGGCTGAGACCAGTGGTC
CATg F1	CTGCCCAACCAAGCGAACGAG
CATg F1′	CCTCGCTACCGTTAATGACAGCG
CATg R1	GTCCCAAGCAGAATCGTGAGCG
CATg F2	CGCCGCAACGTAGGATTCAGG
CATg F2′	AGCGAGGGACCTCAAGTCCA
CATg R2	TTCGCTGTCGGGCTTCGG
AP1	GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGC
AP2	AATAGGGCTCGAGCGG
Catalase A1 cDNA sequencing	
CATc F1	ATGAAGAACCCATTCCAAACG
CATc R1	AAGCGGTAGGTGTTTACACCG
CATc F2	GGAAACAATATCCCCGTC
CATc R2	GTCTCGGCAAAGTAGTTG
CATc F3	TGCTTCAGGGTCGTATCTTCTC
CATc R3	CGGGGCTGAGACCAGTGGTC
Real-time PCR	
CATA1rt F	CTTTGCTTCAGGGTCGTATCT
CATA1rt R	GGCTCCGTCTCGATTGTTATTA
SODCrt F	ACACCTTCGGCGACAATAC
SODCrt R	GTCTTCAGACTCTCCTCGTTTC
ACTrt F	CCCTTGACTTTGAGCAGGAGATCCA
ACTrt R	CTCAAGACCGAGGACAGAGGGCTG

CATd primers: degenerate primers used to amplified an internal fragment of catalase A1 gene (M: A or C; Y: C or T; B: C, G or T; H: A, C or T; R: A or G). CATg primers: primers used in walking-PCR to determine the upstream and downstream ends of catalase A1 gene together with AP1 and AP2 primers directed towards the adaptor. CATc primers: primers used for cDNA sequencing. rt primers: primers used for real-time quantitative PCR.

Amplification was performed as follows: 5 min of denaturation at 95 °C, followed by 30 cycles of denaturation (30 s at 95 °C), annealing (30 s at 60 °C), and extension (1 min at 72 °C), with a final extension of 10 min at 72 °C. The amplified product was purified with the High Pure PCR Products Purification Kit (Roche Diagnostics, Meylan, France) following the manufacturer's recommendations and then cloned into the pGEM®-T Easy Vectors (Promega, Charbonnières, France). The corresponding alkaline lysis purified plasmids were sent for bidirectional Sanger sequencing with universal T7 and SP6 primers at GATC Biotech Platform (Köln, Germany).

After sequencing of the amplified catalase gene fragment, walking-PCR procedure (Siebert *et al.* 1995) was performed in order to determine the upstream and downstream ends of CATA1 gene as described before (Ghamrawi *et al.* 2014). The amplified product was purified with the High Pure PCR Products Purification Kit (Roche), and then cloned and sequenced as described above.

Fungal RNA extraction

Total RNA were extracted from 24 h hyphae harvested by centrifugation at 4000× *g* for 15 min, by grinding in liquid nitrogen followed by a mechanical disruption with glass beads. The resulting powder was resuspended at a ratio of 200 mg of powder for 1 mL of TRIzol® (Invitrogen by life technologies™, Fisher Scientific, Illkirch, France). Nucleic acids were then extracted by addition of chloroform (0.2 vol) followed by centrifugation at 12 000× *g* for 15 min. RNA were then precipitated from the aqueous phase by the addition of isopropanol (0.5 vol). After incubation for 10 min on ice and centrifugation, the RNA pellet was washed with 70 % ethanol, followed by centrifugation at 7500× *g* for 5 min and finally resuspended in DEPC-treated water. Genomic DNA was then digested using DNA-free™ Kit (Ambion by Life technologies™) as recommended by the manufacturer. Total RNA were loaded on 1 % agarose gel to verify their integrity after purification.

Catalase A1 cDNA sequencing

One microgram of total RNA was incubated for 1 h at 37 °C in the presence of 2.65 μg oligodT (Amersham Biosciences), 2 μL of 10 mM each deoxynucleoside triphosphate, 40 U RNasin RNase inhibitor and 200 U Moloney murine leukaemia virus reverse transcriptase (Promega) in a final volume of 50 μL. Two microliters of the obtained cDNAs were then used for PCR amplification which was performed as follows: 5 min of denaturation at 95 °C, followed by 30 cycles of denaturation (30 s at 95 °C), annealing (30 s at 60 °C), and extension (1 min at 72 °C), with a final extension of 10 min at 72 °C. After purification, the amplified product was cloned and sequenced as above.

Sequence analysis

Sequence analysis was performed using FinchTV 1.4 (http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml) as chromatogram viewer, the Translation tool in ExPASy SIB Bioinformatics Resource Portal (http://web.expasy.org/translate/) and The Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) in NCBI for

research of similarity in the Genbank database. Accession numbers of the sequences used in the GenBank database (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/) were: *Colletotrichum orbiculare* KB726076 (protein ENH77922.1), *Myceliophthora thermophila* XM_003662984 (protein XP_003663032), *Colletotrichum gloeosporioides* AMYD01001794 (protein EQB51570), *Metarhizium acridum* GL698492 (protein EFY90197.1), *Aspergillus oryzae* AB078864.2 (protein BAC55897), *Aspergillus flavus* XM_002380848 (protein XP_002380889), *Aspergillus fumigatus* U97574.1 (protein AAB71223), and *Scedosporium apiospermum* JOWA01000087 (protein KEZ44801.1). Comparison was performed using stretcher global alignment from EMBOSS-Lite – Sequence Comparison (http://helixweb.nih.gov/emboss_lite/compare.html). Prediction of exon–intron position was performed using Genscan (http://genes.mit.edu/GENSCAN.html). Amino acid sequence was analyzed using the Centre for Biological Sequence (CBS) analysis server from the Technical University of Denmark (DTU) (http://www.cbs.dtu.dk/index.shtml). Search for predicted signal peptide, N- and O-glycosylation sites was performed using SignalP 4.1 server (http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/), NetNglyc 1.0 server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/), and NetOglyc 4.0 server (http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/), respectively.

Protein domains, families, and functional sites as well as associated patterns and profiles were identified using ScanProsite tool (http://prosite.expasy.org/).

Scedosporium boydii *hyphal growth evaluation*

Growth of *S. boydii* was determined after 24 h, 48 h, 72 h, and 96 h as a function of the mycelial dry weight. Cultures were taken, passed through a wool filter and then kept at 50 °C until their weights were constant. RNA were extracted and purified as described above and loaded on 1 % agarose gel to verify their integrity at each time point. Gene expression was then evaluated by real-time PCR.

Gene expression analysis by real-time PCR

Relative quantification of mRNA was performed in a *Step One Plus* (Applied Biosystems, Foster City, CA) real-time PCR (RT-PCR) instrument using the Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems). Gene specific primers designed by an *in silico* screening with the BLAST alignment algorithm were used at 0.4 μM with 10 μL of Fast SYBR® Green Master Mix and 2 μL of cDNA in a final volume of 20 μL. The PCR thermal profile consisted of an initial incubation at 95 °C for 10 min followed by 40 cycles at 95 °C for 15 s and 61 °C for 1 min. Quantitative RT-PCR was done using three replicates per gene. Gene encoding actin (*ACT*) was chosen as reference gene (Fang & Bidochka 2006) for normalizing the expression of *CATA1* and *SODC* genes in each experimental conditions and hyphae from 24-h-old cultures were used as control. Relative gene expression was determined according to the formula: (Livak & Schmittgen 2001)

$$2^{-\left[\Delta Ct\left(Ct_{target}-Ct_{reference}\right)experiment-\Delta Ct\left(Ct_{target}-Ct_{reference}\right)control\right]}$$

Scedosporium boydii *culture in stress conditions*

To mimic environmental conditions encountered in the CF airways, conidia were incubated for 24 h under hypoxia (5 % O_2) or hypercapnia (5 % CO_2), or with MES buffer (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid) 0.5 M pH 5.3 or 165 mM NaCl. Then, total RNA were extracted from the obtained hyphae and reverse transcribed into cDNA for quantification of gene expression by RT-PCR as described above. Total RNA from 24-h-old hyphae grown in YPD broth under normal atmosphere conditions were used as control.

Scedosporium boydii *stimulation by H_2O_2, menadione and paraquat*

To mimic oxidative stress, H_2O_2 at different concentrations (31.25 μM, 62.5 μM, 125 μM, 250 μM, 500 μM, 1 mM, 2 mM, and 4 mM), chosen according to previous studies (Huh & Kang 2001; Lamarre *et al.* 2001; Hwang *et al.* 2003), was added each hour during 3 h onto 24-h-old hyphae. Experiments were also conducted using menadione (Sigma–Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) or paraquat (Methyl viologen dichloride hydrate; Sigma) which were added in one time onto 24-h-old hyphae at the same different concentrations. Total RNA were extracted from hyphae and reverse transcribed into cDNA for quantification of gene expression.

Scedosporium boydii *co-culture with phagocytic cells*

The human myelomonocytic leukaemia cell line THP-1 (ATCC) was cultivated in RPMI 1640 medium and the human promyelocytic cell line HL60 (ATCC) was cultivated in IMDM, both supplemented with 10 % fetal calf serum (PAA Laboratories, Pashing, Austria), 2 mM L-glutamine, 1 mM sodium pyruvate, 0.1 mM non essential amino acids, 10 mM HEPES, 100 U/mL penicillin and 100 mg mL^{-1} streptomycin (all from Lonza, Verviers, Belgium). Cells were grown in T175 vented flasks (BD, Falcon) at 37 °C under 5 % CO_2 at a density comprised between 2×10^5 and 10^6 cells/mL, as recommended by ATCC. THP-1 were differentiated into macrophages (referred as THP-1-derived macrophages) using 50 ng mL^{-1} phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) (Sigma) for 3 h and HL60 were differentiated into neutrophils using DMSO 1.3 % (Sigma) for 3 d. Cells were washed and let in supplemented medium overnight at a concentration of 1.1×10^5 cells per cm^2. Then, cells were stimulated with 2 μg mL^{-1} LPS (lipopolysaccharides from *Escherichia coli* O111:B4; Sigma) and co-cultured with *S. boydii* hyphae at a 1:3 ratio 24 h after stimulation for THP-1 cells or during stimulation for HL60 cells.

Human peripheral blood neutrophils were isolated from healthy donors. Briefly, fresh blood was mixed with citrate/dextran sedimentation prior to centrifugation as reported previously. After ficoll enrichment, red blood cells were removed by the addition of 9 mL of sterilized distilled ice-cold water for 30 s, followed by the addition of 1 mL of 10-fold concentrated PBS. Finally, the cells were collected and resuspended in RPMI 1640. Neutrophils were cultured in RPMI 1640 supplemented medium. The purity of neutrophils,

based on their CD3-negative CD66b-positive expression, always was greater than 99 %. Activation state of neutrophils was checked based on the expression of CD62L. Cell death was evaluated by staining with 7-aminoactinomycin D (BD Pharmingen, San Diego, CA). Before the experiment, neutrophils (1×10^6 cells/mL) were cultured in T175 vented flasks (BD, Falcon) at 37 °C under 5 % CO_2. Neutrophils were then stimulated with 500 ng mL^{-1} LPS and finally co-cultured with *S. boydii* hyphae at a 1:3 ratio.

Total RNA were then extracted from hyphae and reverse transcribed into cDNA for quantification of gene expression as described above.

Statistical analysis

Student's t test was performed to compare quantitative real-time PCR data and results were considered significantly different when $p < 0.05$.

Results

Nucleotide sequence of Scedosporium boydii CATA1 *gene*

An internal fragment of 1125 bp of the gene encoding the enzyme was first identified using degenerate primers designed from sequence alignment of four fungal genes encoding secreted catalases. The amplified product was then sequenced, and a database search for sequence homology revealed a high similarity with several monofunctional fungal catalases.

Complete sequence of the gene was then obtained by walking-PCR and deposited in the GenBank database under the accession number KR105769. Analysis of the nucleotide sequence of the gene which comprised 2563 bp suggested the presence of six putative exons (Fig 1), as it occurs for *Colletotrichum orbiculare* and *Aspergillus fumigatus* catalase genes (Table 2). Length and position of introns were then confirmed by cloning and sequencing the cDNA obtained by RT-PCR using primers targeting the ends of the whole gene and inner regions of the catalase gene.

As described in Table 2, the most important homologies were seen, in decreasing order, with *C. orbiculare*, *Metarhizium acridum*, *Myceliophthora thermophila*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus flavus*, and *A. fumigatus* catalase genes. Similarly to *A. fumigatus*, *CATA1* gene from *S. boydii* had six exons, while homologous genes in *M. thermophila* and *C. gloeosporioides* had seven and eight exons, respectively. A high variability was seen in the size of these genes and in their nucleotide sequence (Table 2). Nucleotide sequence of catalase genes from other *Scedosporium* species or *Lomentospora prolificans* was not available at the beginning of our work. Since, the whole genome sequence of *Scedosporium apiospermum sensu stricto* has been published (Vandeputte *et al.* 2014). Sequences of CATA1 gene from *S. boydii* and *S. apiospermum* therefore were compared. A same number of exons was seen, as well as a high homology in both gene (93 %) and cDNA (95 %) sequences.

Analysis of the protein sequence deduced from Scedosporium boydii CATA1 *gene*

The cDNA comprised 2178 bp suggesting a protein of 725 amino acids with a predicted molecular mass of 80.26 kDa and an isoelectric point of 5.41. Analysis of the deduced protein sequence revealed a catalase profile between amino acids 59 and 559 and two signature patterns typical of catalases were detected, corresponding to a catalase proximal active site between amino acids 98 and 114 (with the predicted catalytic site at position 109) and to a catalase proximal heme-ligand binding site between amino acids 392 and 400.

Six putative N-glycosylation sites and 11 putative O-glycosylation sites (eight threonine and three serine residues) were found. Moreover, the N-terminal region of *S. boydii* catalase A1 comprised a 26 amino acid-motif corresponding to a signal secretion peptide.

Finally, multiple sequence alignment of homologous proteins in other taxonomically closed species including *Colletotrichum orbiculare*, *Metarhizium acridum*, *Myceliophthora thermophila*, *Colletotrichum gloeosporioides*, and *Aspergillus fumigatus* revealed 76.9 to 71.7 % similarity (Table 2). Among these fungi, the lowest similarity was seen with *A. fumigatus* secreted Cat 1 protein. Conversely, a very high identity rate in deduced protein sequences (98 %) was observed with catalase from *Scedosporium apiospermum sensu stricto*.

Scedosporium boydii CATA1 *and* SODC *gene expression during hyphal growth*

We first analyzed CATA1 gene expression in hyphae aged of 24–96 h (Fig 2A). CATA1 gene expression slightly increased in 48 h-old hyphae compared to 24-h-old hyphae whereas actin and SODC genes had stable expression. Interestingly, lower gene expression was found for all these genes in 72-h-old hyphae and even more in 96-h-old hyphae, suggesting progressive degradation of RNA after 48 h of incubation (Fig 2B). Interestingly, growth curve established from determination of the mycelial dry weight, showed that the fungus reached out the stationary phase after 72 h of incubation (Fig 2C). Therefore, subsequent experiments were carried out with 24-h-old hyphae.

Scedosporium boydii CATA1 *and* SODC *gene expression in environmental conditions encountered in the CF airways*

CATA1 and SODC gene expression was then evaluated in different conditions mimicking those encountered in the CF airways to evaluate the potential effect of these conditions. However, no significant differences were seen in the relative expression levels of CATA1 and SODC genes between controls and hyphae grown in hypersaline or acid pH culture media, nor under hypoxia or hypercapnia (Fig 3).

Scedosporium boydii CATA1 *gene expression is highly stimulated by oxidative stress*

Since catalase and superoxide dismutase may be involved in resistance to the oxidative stress, we evaluated the expression

```
+1      atgaagaacccattccaaacgaacctgccatttttggctctactaaacctttcaacgatggcttccctagtgtcgggtcaatgccccttt
         M  K  N  P  F  Q  T  N  L  P  F  L  A  L  L  N  L  S  T  M  A  S  L  V  S  G  Q  C  P  F 30
+91     gcgaacaggctcaagacgaggcaggagcagggcagcggtggtgactctcgctccttcatccagcataacgacgtcgaagatggcgacgtt
         A  N  R  L  K  T  R  Q  E  Q  G  S  G  G  D  S  R  S  F  I  Q  H  N  D  V  E  D  G  D  V 60
+181    tacatgacgtcggatgtcggtggaccgattgcagaccagaggagcttgagagccggagatcggggtccgacgctgcttgaggatttcatt
         Y  M  T  S  D  V  G  G  P  I  A  D  Q  R  S  L  R  A  G  D  R  G  P  T  L  L  E  D  F  I 90
+271    ttcaggcagaagattaccaggtttgatcatgagcgagtacgtgtttgaagagcagagaatctttctcttgcccctctttattccctctac
         F  R  Q  K  I  T  R  F  D  H  E  R                                                      102
+361    cttttcttgggctatcaactggagattcttttgacgcttacactggaaattaacaggtacctgaacgtgttgtccatgcccgaggcgctg
                                                                 V  P  E  R  V  V  H  A  R  G  A  113
+451    gtgcctatggaaagttcgtcagctatggcgactatagcaacatcactgccgcctccttcttgagctccgagggcaaggagactcctgttt
         G  A  Y  G  K  F  V  S  Y  G  D  Y  S  N  I  T  A  A  S  F  L  S  S  E  G  K  E  T  P  V 143
+541    tcgtgcgcttctcgactgtccttggatcgaggggcagccctgataccgttcgtgatgtccacggttttgcgacgcgattgtatgtcttct
         F  V  R  F  S  T  V  L  G  S  R  G  S  P  D  T  V  R  D  V  H  G  F  A  T  R  F          170
+631    caactgaaacctccaccctggatcctgggcttaacaaggtccgactaacactatatgttgatcgttagctacaccgatgaaggaaactgg
                                                                 Y  T  D  E  G  N  W 177
+721    gatctcgttggaaacaatatccccgtcttctttatccaagatgccattcagtttcccgacgtgatccacgccggcaagccgaagcccgac
         D  L  V  G  N  N  I  P  V  F  F  I  Q  D  A  I  Q  F  P  D  V  I  H  A  G  K  P  K  P  D 207
+811    agcgaaatccctcaggccggaaccgctcacgattctgcttgggacttttcagcatgcagagcactgctcttcacacactcttcttcgcc
         S  E  I  P  Q  A  G  T  A  H  D  S  A  W  D  F  F  S  M  Q  S  T  A  L  H  T  L  F  F  A 237
+901    atgtctggctttggtatccctcgcagctatagacacatggtaggatcggccccccaaaaatttccgctcatgaccttcactaatattgcct
         M  S  G  F  G  I  P  R  S  Y  R  H  M                                                   250
+991    acgcccattaggatggcttcggtgtaaacacctaccgcttcgtcaacgacaggggcgaatccaagcttgtcaagttccactggaagaccc
                  D  G  F  G  V  N  T  Y  R  F  V  N  D  R  G  E  S  K  L  V  K  F  H  W  K  T  276
+1081   tccagggcaaggccagccttgtctgggaggaggcccaagtcactgccggcaccaacatcgatttccaccgcgacgatctctggcaggcca
         L  Q  G  K  A  S  L  V  W  E  E  A  Q  V  T  A  G  T  N  I  D  F  H  R  D  D  L  W  Q  A 306
+1171   tcgaatccggacacgccccgagtgggagtttgccgtgcagcttgtggacgaagaccaagcgcaggctcacggtttcgacgtgcttgacc
         I  E  S  G  H  A  P  E  W  E  F  A  V  Q  L  V  D  E  D  Q  A  Q  A  H  G  F  D  V  L  D 336
+1261   ccaccaagatcatccccgaagaaatcgcgccgttgcagaagcttggaaagttgactcttgataccaaccctcgcaactactttgccgaga
         P  T  K  I  I  P  E  E  I  A  P  L  Q  K  L  G  K  L  T  L  D  T  N  P  R  N  Y  F  A  E 366
+1351   ctgagcagatcatggtaagtgtttgatggggtgagagatttcaggattcaagtgctgacatttggtgcaaaaaaaagttccaacccggcc
         T  E  Q  I  M                                                                F  Q  P  G  375
+1441   acattgttcgcggaatcgactttagcgaggacccttgcttcagggtcgtatcttctcttaccttgatactcagctgagccgtcatggtg
         H  I  V  R  G  I  D  F  S  E  D  P  L  L  Q  G  R  I  F  S  Y  L  D  T  Q  L  S  R  H  G 405
+1531   gtcccaacttgagcaaattcccatcaaccgtccgattacggatgtccataataacaatcgagacggagccgcgcagatgatgattcacg
         G  P  N  F  E  Q  I  P  I  N  R  P  I  T  D  V  H  N  N  N  R  D  G  A  A  Q  M  M  I  H 435
+1621   gcaacactatccactgtaagtttccagccccagagcgagctgcttagcaaagcccagaccttgctgaccgggttcatccgtccagattc
         G  N  T  I  H                                                                   Y  S442
+1711   gcccaactctcttcacgataacctgcccaaccaagcgaacgagaccgacggccgcggcttctttaccgcgccgcaacgtaggattcaggg
         P  N  S  L  H  D  N  L  P  N  Q  A  N  E  T  D  G  R  G  F  F  T  A  P  Q  R  R  I  Q  G 472
+1801   cgactatgtccgagcccttccttcttccttcgacgaccactggtctcagccccgcctcttttacaactccctcacccccgccgagcagca
         D  Y  V  R  A  L  P  S  S  F  D  D  H  W  S  Q  P  R  L  F  Y  N  S  L  T  P  A  E  Q  Q 502
+1891   gcaggtagtcgacgccatccggttcgagactagccaagtcaagtccgatacggtcaagaacaacgtcatcacgcagctgaacaagatcag
         Q  V  V  D  A  I  R  F  E  T  S  Q  V  K  S  D  T  V  K  N  N  V  I  T  Q  L  N  K  I  S 532
+1981   caacgacatcgccgcgcgtgtggccacggctctcggcctcccggtccctgaccctgaccccacgtattaccacgacaacacgacggcggg
         N  D  I  A  A  R  V  A  T  A  L  G  L  P  V  P  D  P  D  P  T  Y  Y  H  D  N  T  T  A  G 562
+2071   cttctctgtccttaaggaccctctgcccacgattgctggtctcagggttggcgtcctcgctaccgttaatgacagcgactccctctcgca
         F  S  V  L  K  D  P  L  P  T  I  A  G  L  R  V  G  V  L  A  T  V  N  D  S  D  S  L  S  Q 592
+2161   agcgagggacctcaagtccaagtttgaccaggagggcgtctcgacgatcgtcgtcgccgagagatacgccgatggcgtcgatgctattta
         A  R  D  L  K  S  K  F  D  Q  E  G  V  S  T  I  V  V  A  E  R  Y  A  D  G  V  D  A  I  Y 622
+2251   ttcgggcattcgcgccaacgccttgatggccttgttattaccaagggaaccgaggccctctttggcgccaacgccactaaccctctgta
         S  G  I  R  A  N  A  F  D  G  L  V  I  T  K  G  T  E  A  L  F  G  A  N  A  T  N  P  L  Y 652
+2341   ccccagaggtcggcccacccagacgctcgaagactcgtataactggggcaagcctgtcgctgccgttggctccgggtccagggcgttcga
         P  R  G  R  P  T  Q  T  L  E  D  S  Y  N  W  G  K  P  V  A  A  V  G  S  G  S  R  A  F  D 682
+2431   cggcagtgtcgttcagaagggtccgggagtgtatacccacaatgatacctcatccgtcgtggactcgttcaaggatggtctccgaacctt
         G  S  V  V  Q  K  G  P  G  V  Y  T  H  N  D  T  S  S  V  V  D  S  F  K  D  G  L  R  T  F 712
+2521   taagttcgtggaccgtttcccgacggataacccctcgcagtaa
         K  F  V  D  R  F  P  T  D  N  P  S  Q  *                                              725
```

Fig 1 – *Scedosporium boydii* genomic DNA region containing the *CATA1* coding gene. Numbering on the left column indicates the relative position from the start of the ORF. Region corresponding to the coding sequence (from .1 to .2563) is double-spaced. Exons are in bold characters as well as the deduced amino acid sequence of the protein which is indicated below the nucleotide sequence and numbered on the right column. The stop codon is indicated by an asterisk. Predicted signal peptide is underlined in the amino acid sequence. Predicted N-glycosylation sites (asparagine residues) are indicated by white squares; predicted O-glycosylation sites are indicated by light grey squares for threonine residues and dark grey squares for serine residues.

of *CATA1* and *SODC* genes in 24-h-old hyphae in response to an oxidative stress with increasing H_2O_2 (Fig 4A), menadione (Fig 4B) or paraquat (Fig 4C) concentrations. Our results showed a progressive increase in *S. boydii* catalase gene expression upon exposure to H_2O_2, menadione or paraquat. *CATA1* gene expression reached a maximum for a 250 μM concentration of H_2O_2 or menadione and a 2 M concentration of paraquat with a 37- ($p = 0.001$), 20- ($p = 0.002$) or 5-fold ($p = 0.001$) increase in relative gene expression level, respectively. In contrast, *SODC* gene relative expression was not modified in the presence of H_2O_2, menadione or paraquat (Fig 4).

Table 2 – Sequence homology data from different fungal catalase genes and deduced proteins.

Species	ORF			cDNA		Deduced protein sequence		
	Length (bp)	Homology (%)	Exons	Length (bp)	Homology (%)	Number of amino acids	Identity (%)	Similarity (%)
Scedosporium boydii	2563	–	6	2178	–	725	–	–
Scedosporium apiospermum	2560	93	6	2178	95	725	98	99
Colletotrichum orbiculare	2394	63.2	6	2136	66.9	711	64.9	76.9
Metarhizium acridum	2487	60.8	6	2148	64.3	715	63.2	75.6
Myceliophthora thermophila	2665	60.6	7	2154	68.4	717	63.6	75.7
Colletotrichum gloeosporioides	2524	60.5	8	2097	66.8	698	63.3	74.9
Aspergillus oryzae	2471	58.9	6	2178	64.4	725	60.8	73.1
Aspergillus flavus	2474	58.8	6	2178	64.2	725	60.9	73.1
Aspergillus fumigatus	2502	57.7	6	2187	63.2	728	59.6	71.7

Scedosporium boydii CATA1 gene is overexpressed in co-culture with phagocytic cells

To investigate the potential role of *CATA1* and *SODC* genes in the context of the innate immune response, their expression was evaluated in co-cultures with different phagocytic cells. Relative expression of *S. boydii CATA1* and *SODC* genes was determined after 1–48 h of co-culture. In co-culture experiments performed with LPS-activated THP-1-derived macrophages, the relative expression of *S. boydii CATA1* gene progressively increased after 3 h of incubation, reaching a 6-fold increase ($p = 0.01$) after 7 h and a maximum of 26-fold ($p = 0.002$) after 12 h before decreasing to basal level at 48 h (Fig 5A). Similar experiments were also conducted with neutrophils, but shorter incubation times (from 30 min to 3 h) were used for determination of gene expression level due to the physiology of neutrophils which release ROS in a very fast manner. With LPS-activated HL60-derived neutrophils, the relative expression of *S. boydii CATA1* gene reached a maximum with a 17-fold increase ($p = 0.005$) after 75 min of co-culture (Fig 5B). Likewise, with activated human peripheral blood neutrophils, *S. boydii CATA1* gene expression reached a maximum with a 15-fold increase ($p = 0.04$) after 60 min of co-culture (Fig 5C). Interestingly, *SODC* gene expression was not significantly modulated during co-culture with any phagocytic cells (Fig 5).

Discussion

To date, the mechanisms developed by *Scedosporium boydii* to evade the host immune defenses are still unknown and very few putative virulence factors have been characterized so far. Phagocytic cells play the major role in the host immune defenses by the oxidative burst response and the secretion of various antimicrobial compounds, especially ROS. Catalases and superoxide dismutases are well known to provide efficient systems to evade the oxidative stress generated by the host phagocytic cells and to thwart the deleterious effects of ROS. Recent biochemical characterization of the major catalase produced by *S. boydii* (Mina *et al.* 2015) allowed us to identify the encoding gene and to evaluate its possible role against oxidative stresses induced chemically or generated by macrophages derived from THP-1 monocytes or by neutrophils.

Sequencing the *S. boydii CATA1* gene and cDNA lead us to obtain the deduced protein sequence. This protein sequence revealed the presence of six potential N-glycosylation sites and eleven O-glycosylated sites which confirms the presence of glycosylated residues demonstrated previously on the purified enzyme by affinity chromatography and Western-blotting (Mina *et al.* 2015). The N-terminal region of *S. boydii* catalase A1 comprised a 26 amino acid-motif corresponding to a signal peptide responsible for the membrane translocation of the protein and its secretion into the culture medium, which is in agreement with detection of the enzyme in culture supernatants (Mina *et al.* 2015).

The recent availability of the whole genome sequence from *S. apiospermum sensu stricto* (Vandeputte *et al.* 2014) allowed us to identify an homologous gene in this genome. As expected, a high homology in gene (93 %) and cDNA (95 %) sequences and a very high identity in the deduced protein sequences (98 %) were observed between the two sibling species. In contrast, comparison of catalase A1 sequence with other homologous genes in the fungal kingdom revealed high rate of divergence. A maximum identity of 63.2 % (nucleotide sequence) and 64.9 % (protein sequence) was observed with *Colletotrichum orbiculare*, which also belongs to the class of Sordariomycetes. Interestingly, the lowest identity rates, 57.7 % for nucleotide sequence and 59.6 % for protein sequence, were observed with *Aspergillus* species which belong to the Eurotiomycetes. These discrepancies explain at least in part the interest of catalases as serodiagnosis markers of fungal infections.

Currently, the diagnosis of a *Scedosporium* infection is based on the detection of serum antibodies using a total antigenic extract comprising various cell wall or cytoplasmic proteins and polysaccharides. However, some of these molecules may be shared by *Scedosporium apiospermum* and *Aspergillus fumigatus*, thus leading in the host to numerous cross-reacting antibodies. Consequently it may be difficult to differentiate between scedosporiosis and aspergillosis by serological tests using such crude antigenic extracts. Recently, catalase A1 recombinant protein from *A. fumigatus* has been used to detect serum antibodies directed toward the mycelial catalase Cat1 of *A. fumigatus* and confirmed its usefulness as a serodiagnosis tool of *Aspergillus* infections (Sarfati *et al.* 2006). Analysis of deduced protein sequences suggests that there are enough epitope differences between *S. boydii*

catalase A1 and its ortholog in *A. fumigatus*. Indeed, our previous study showed that a specific serological test for scedosporiosis could be developed using biochemically purified *S. boydii* catalase A1 (Mina *et al.* 2015). Moreover, anti-*Lomentospora prolificans* catalase immunoglobulins A were detected in the saliva from healthy immunocompetent individuals (Pellon *et al.* 2014). Taken together, these results confirm the potential use of catalase recombinant proteins as tools for the serodiagnosis of scedosporiosis and aspergillosis.

In addition, evaluation of *S. boydii CATA1* and *SODC* gene expression in different conditions encountered by the fungus in the CF airways suggest that catalase A1 may also be an important virulence factor. In CF, loss of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator functionality leads to particular environmental conditions such as hypoxia, hypercapnia, low pH and high salt concentrations (Tang *et al.* 2014). Conidia are trapped into the sticky mucus and should survive despite these particular conditions. *CATA1* and *SODC* gene expression was evaluated in different conditions mimicking those encountered in the CF airways, but no differences were seen compared to the control. These results suggest that the CF microenvironment does not modulate expression of these genes.

However, to survive in the host and to colonize or cause disease, the fungus also must evade the host immune defenses, including killing mechanisms mediated by ROS (Nathan & Shiloh 2000). Since oxygen-tolerating organisms orchestrate their redox signaling networks when production of ROS overwhelms, damages of cellular components may ensue which are thought to contribute to pathogenesis of a number of microorganisms including those colonizing the respiratory tract. Adaptation to oxidative stress may explain survival of many species during the inflammatory process, and this may be particularly important for microorganisms colonizing the CF airways because of the excessive inflammatory response which characterizes this genetic disease (Murphy 1991; de Pauw & Meunier 1999; Verduyn Lunel *et al.* 1999). Stress-inducible defenses act to protect cells from oxidative threats, but the corresponding genes have not been yet identified in *S. boydii* except *CATA1* in this study and *SODC* (Lima *et al.* 2007).

Our results showed that *S. boydii CATA1* gene is highly stimulated by oxidative stress, with a maximum relative gene expression in the presence of 250 μM H_2O_2 (37 fold

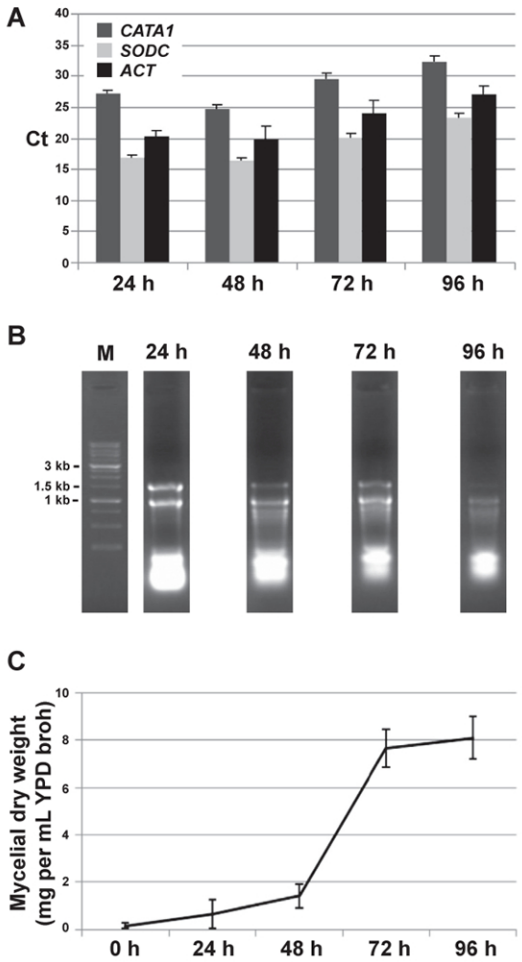


Fig 2 – Correlation between gene expression, RNA integrity, and growth. (A): *CATA1* (dark grey), *SODC* (light grey), and *ACT* (black) gene expression (in Ct). (B): Agarose gel analysis of RNA extracted from hyphae (M = Molecular Weight Marker 1 kb; Nippon genetics). (C): Growth curve of the fungus established by determination of the mycelial dry weight (mg per mL of YPD broth).

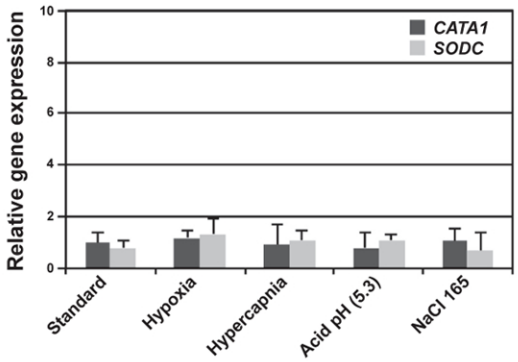


Fig 3 – Relative expression of *CATA1* and *SODC* genes in *S. boydii* 24-h-old hyphae in the environmental conditions encountered in the CF airways. Relative expression of *CATA1* (dark grey) and *SODC* (light grey) genes was determined after culture in conditions that mimic environmental conditions encountered in the CF airways. Conidia in YPD broth were incubated for 24 h at 37 °C without shaking under normal atmosphere conditions (Standard), or under hypoxia (5 % O_2) or hypercapnia (5 % CO_2) or in the presence of MES buffer (2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid) 0.5 M pH 5.3 or with 165 mM NaCl. Data represent mean values ± SD from three independent experiments.

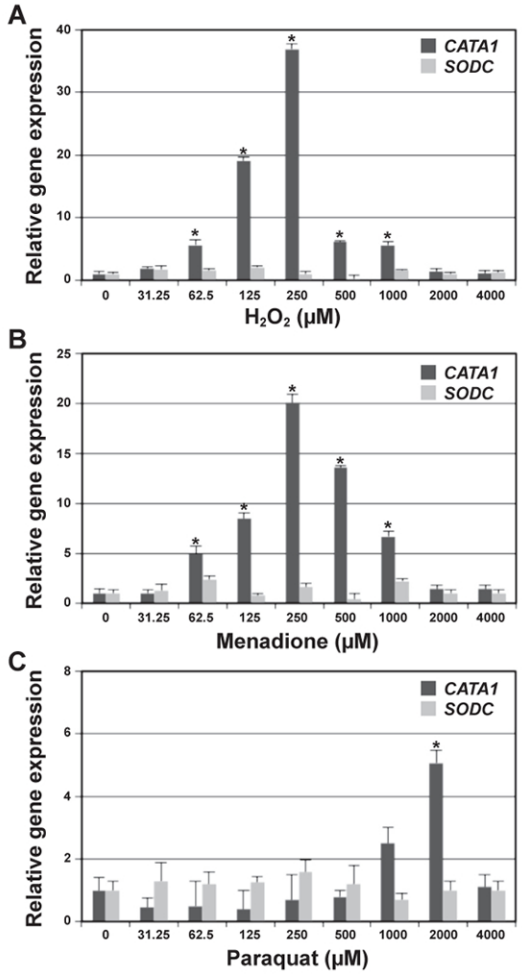


Fig 4 – Relative expression of *CATA1* and *SODC* genes in *S. boydii* 24-h-old hyphae after oxidative stress stimulation. Relative expression of *CATA1* (dark grey) and *SODC* (light grey) genes was determined after oxidative stress induced with H_2O_2 (A), menadione (B) or paraquat (C). Data represent mean values ± SD from three independent experiments. Significant differences with the reference (*i.e.* time 0 of contact with cells) are indicated by an asterisk.

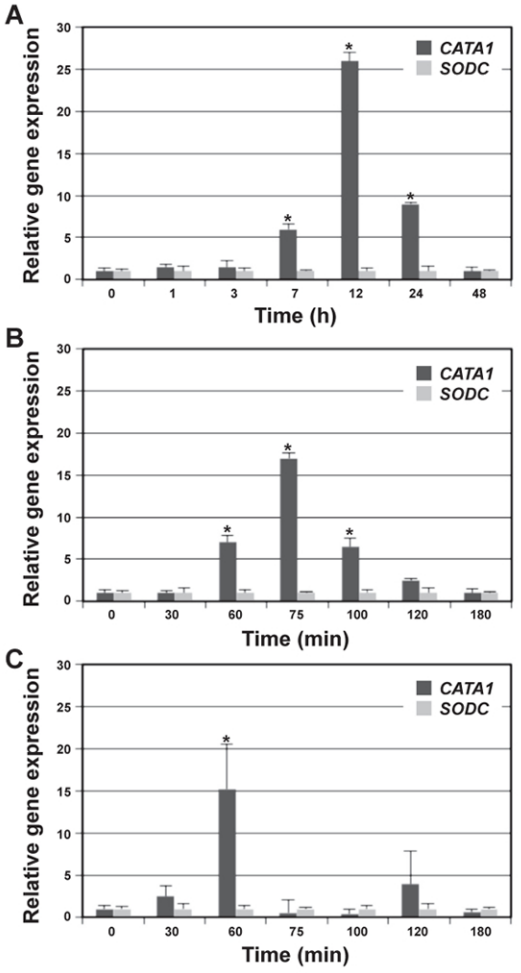


Fig 5 – Relative expression of *CATA1* and *SODC* genes in *S. boydii* hyphae co-cultivated with phagocytic cells. Relative expression of *CATA1* (dark grey) and *SODC* (light grey) genes was determined after co-culture of 24-h-old *S. boydii* hyphae with LPS activated THP1-derived macrophages (A), LPS activated HL60-derived neutrophils (B) or activated human peripheral blood neutrophils (C). Data represent mean values ± SD from three independent experiments. Significant differences with the reference (*i.e.* time 0 of contact with cells) are indicated by an asterisk.

increase), 250 µM menadione (20 fold) or 2 mM paraquat (5 fold). These results are consistent with those reported for *CATB* gene from *Aspergillus nidulans* which is induced by H_2O_2 (Kawasaki *et al.* 1997; Kawasaki & Aguirre 2001). In contrast, the presence of H_2O_2, menadione or paraquat did not affect *SODC* gene expression, thus suggesting constitutive expression of this gene in *S. boydii*. Interestingly, *CgSOD1 gene* encoding a Cu,Zn-SOD in *Candida glabrata* was reported to be constitutively expressed (Briones-Martin-Del-Campo *et al.* 2014).

However, deletion mutants of catalase genes in *A. nidulans* are still able to grow on substrates with ROS (Kawasaki *et al.* 1997; Kawasaki & Aguirre 2001) and are still virulent (Chang *et al.* 1998). Likewise, virulence was not affected for *A. fumigatus* in catalase deletion mutants (Calera *et al.* 1997; Paris *et al.* 2003) suggesting alternative pathways and enzymes implicated in the detoxification of ROS.

The exposure of bacteria or fungi to low levels of H_2O_2 or O_2^- generating agents is well known to switch on resistance

to these oxidants. In *Escherichia coli*, nine H_2O_2-inducible proteins have been identified including a *CATG* gene encoding a catalase controlled by the transcriptional regulator OxyR, and the *SODA* gene encoding a Mn-SOD which is controlled by the SoxR/S transcriptional regulators (Storz *et al.* 1990; Demple & Amábile-Cuevas 1991). In addition, it has been demonstrated that oxidative stress results in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida albicans* in overexpression of numerous genes (Collinson & Dawes 1992; Jamieson *et al.* 1994). Upon exposure to low doses of H_2O_2, at least 167 proteins in *S. cerevisae*, identified by two-dimensional gel electrophoresis and genome-wide experimental approach, were overexpressed, in particular cytochrome C peroxydase (Ccp1p), cytosolic catalase (Ctt1p), Cu,Zn-SOD and Mn-SOD (Sod1p et Sod2p) and glutathione reductase (Glr1p) (Godon *et al.* 1998). In double homozygous mutants *tps1*/*tps1* of *C. albicans* (deficient in trehalose synthesis) incubated with low levels of H_2O_2 (0.5 mM), expression of catalase, glutathione reductase, Cu,Zn- and Mn-SODs was induced, whereas glucose-6-phosphate dehydrogenase activity remained unchanged. However, a higher level of H_2O_2 (50 mM) induced catalase and glutathione reductase gene expression, but strongly inhibited SOD activity (González-Párraga *et al.* 2003).

To further examine the potential role of *CATA1* and *SODC* genes in the context of the inflammatory response, expression of these genes was evaluated in co-cultures with activated phagocytic cells. Our findings showed that upon exposure to activated THP-1-derived macrophages, HL60-derived neutrophils or human peripheral blood neutrophils, hyphae responded by increasing *CATA1* gene expression, suggesting its involvement in degradation of ROS produced by phagocytic cells. *SODC* gene was shown to be constitutively expressed, as seen with chemically induced oxidative stress, suggesting that basal expression of this gene is sufficient for the corresponding enzyme to play its anti-oxidative role or that other genes are more important in the anti-oxidative mechanisms used by *S. boydii*. Upon exposure to activated phagocytic cells, the relative expression level of *S. boydii CATA1* gene increased more rapidly with human peripheral blood neutrophils or HL60-derived neutrophils (60 and 75 min) than with THP-1-derived macrophages (12 h). This may be due to differences in physiology of these cells. Indeed, neutrophils release ROS in a very fast manner in comparison to macrophages.

The pattern of gene expression upon exposure to host immune cells has been studied in *C. albicans* co-cultivated with neutrophils (Fradin *et al.* 2005). Results showed that genes encoding catalase, glutathione-peroxidase, thioredoxin reductase, and superoxide dismutase were up-regulated in *C. albicans* upon interaction with neutrophils, and thus suggested that these genes are likely to be involved in the detoxification of ROS. Other genes are probably implicated in the detoxification of ROS in *S. boydii* and it should be of interest to identify factors up-regulated in the presence of phagocytic cells now that the co-culture method is effective.

Conclusions

In conclusion, phagocytic cells play the major role in the host immune defenses by the oxidative burst response and the secretion of ROS. Our results demonstrate the up-regulation of *Scedosporium boydii CATA1* gene and the constitutive expression of *SODC* gene in response to oxidative stress, which may be helpful to explain survival of the fungus during the inflammatory process. Nevertheless, deletion of these genes and identification of other genes involved in anti-oxidative mechanisms will be essential to understand the adaptative mechanisms developed by *S. boydii* to evade the host immune defenses.

Acknowledgments

This research was supported by funds to M.J.J.F. from Vaincre la mucoviscidose [RF20130500840] and [RF20140501104]. C.S. was supported by a grant from Vaincre la mucoviscidose [RF20140501104].

REFERENCES

Bertrand S, Larcher G, Landreau A, Richomme P, Duval O, Bouchara JP, 2009. Hydroxamate siderophores of *Scedosporium apiospermum*. *Biometals* **22**: 1019–1029.

Borghi E, Iatta R, Manca A, Montagna MT, Morace G, 2010. Chronic airway colonization by *Scedosporium apiospermum* with a fatal outcome in a patient with cystic fibrosis. *Medical Mycology* **48** (Suppl 1): S108–S113.

Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrère J, Favennec L, Ranque S, Gangneux JP, Horré R, Bouchara JP, 2010. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Medical Mycology* **48** (Suppl 1): S88–S97.

Briones-Martin-Del-Campo M, Orta-Zavalza E, Juarez-Cepeda J, Gutierrez-Escobedo G, Cañas-Villamar I, Castaño I, De Las Peñas A, 2014. The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Revista Iberoamericana de Micología* **31**: 67–71.

Calera JA, Paris S, Monod M, Hamilton AJ, Debeaupuis JP, Diaquin M, López-Medrano R, Leal F, Latgé JP, 1997. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **65**: 4718–4724.

Castiglioni B, Sutton DA, Rinaldi MG, Fung J, Kusne S, 2002. *Pseudallescheria boydii* (Anamorph *Scedosporium apiospermum*). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. *Medicine (Baltimore)* **81**: 333–348.

Chang YC, Segal BH, Holland SM, Miller GF, Kwon-Chung KJ, 1998. Virulence of catalase-deficient *Aspergillus nidulans* in p47(phox)-/- mice. Implications for fungal pathogenicity and host defense in chronic granulomatous disease. *The Journal of Clinical Investigation* **101**: 1843–1850.

Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP, 2000. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **19**: 53–56.

Collinson LP, Dawes IW, 1992. Inducibility of the response of yeast cells to peroxide stress. *Journal of General Microbiology* **138**: 329–335.

Crawford DR, Davies KJ, 1994. Adaptive response and oxidative stress. *Environmental Health Perspectives* **102** (Suppl 10): 25–28.

de Pauw BE, Meunier F, 1999. The challenge of invasive fungal infection. *Chemotherapy* **45** (Suppl 1): 1–14.

Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, Diouri M, Hallet JN, Bouchara JP, 2002. Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 2108–2114.

Demple B, Amábile-Cuevas CF, 1991. Redox redux: the control of oxidative stress responses. *Cell* **67**: 837–839.

Fang W, Bidochka MJ, 2006. Expression of genes involved in germination, conidiogenesis and pathogenesis in *Metarhizium anisopliae* using quantitative real-time RT-PCR. *Mycological Research* **110**: 1165–1171.

Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, Hube B, 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Molecular Microbiology* **56**: 397–415.

Ghamrawi S, Rénier G, Saulnier P, Cuenot S, Zykwinska A, Dutilh BE, Thornton C, Faure S, Bouchara JP, 2014. Cell wall modifications during conidial maturation of the human pathogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *PLoS One* **9**: e100290.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J, 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 4930–4942.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J, 2008. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *Journal of Clinical Microbiology* **46**: 766–771.

Godon C, Lagniel G, Lee J, Buhler JM, Kieffer S, Perrot M, Boucherie H, Toledano MB, Labarre J, 1998. The H_2O_2 stimulon in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 22480–22489.

González-Párraga P, Hernández JA, Argüelles JC, 2003. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress H(2) O(2) and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast* **20**: 1161–1169.

Guarro J, Kantarcioglu AS, Horré R, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, de Hoog GS, 2006. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Medical Mycology* **44**: 295–327.

Horré R, Marklein G, 2009. Isolation and clinical significance of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species. *Medical Mycology* **47**: 415–421.

Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Nidermajer S, Reiffert SM, 2009. Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients. *Respiration* **77**: 320–324.

Huh WK, Kang SO, 2001. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochemical Journal* **356**: 595–604.

Husain S, Muñoz P, Forrest G, Alexander BD, Somani J, Brennan K, Wagener MM, Singh N, 2005. Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* in transplant recipients: clinical characteristics and impact of antifungal agent therapy on outcome. *Clinical Infectious Diseases* **40**: 89–99.

Hwang CS, Baek YU, Yim HS, Kang SO, 2003. Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* **20**: 929–941.

Jamieson DJ, Rivers SL, Stephen DW, 1994. Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* proteins induced by peroxide and superoxide stress. *Microbiology* **140** (Pt 12): 3277–3283.

Katragkou A, Dotis J, Kotsiou M, Tamiolaki M, Roilides E, 2007. *Scedosporium apiospermum* infection after near-drowning. *Mycoses* **50**: 412–421.

Kawasaki L, Aguirre J, 2001. Multiple catalase genes are differentially regulated in *Aspergillus nidulans*. *Journal of Bacteriology* **183**: 1434–1440.

Kawasaki L, Wysong D, Diamond R, Aguirre J, 1997. Two divergent catalase genes are differentially regulated during *Aspergillus nidulans* development and oxidative stress. *Journal of Bacteriology* **179**: 3284–3292.

Kiffer-Moreira T, Pinheiro AA, Pinto MR, Esteves FF, Souto-Padrón T, Barreto-Bergter E, Meyer-Fernandes JR, 2007. Mycelial forms of *Pseudallescheria boydii* present ectophosphatase activities. *Archives of Microbiology* **188**: 159–166.

Lackner M, de Hoog GS, Yang L, Ferreira Moreno L, Ahmed S, Andreas F, Kaltseis J, Nagl M, Lass-Flörl C, Risslegger B, Rambach G, Speth C, Robert V, Buzina W, Chen S, Bouchara J-P, Cano-Lira J, Guarro J, Gené J, Fernández Silva F, Haido R, Haase G, Havlicek V, Garcia-Hermoso D, Meis J, Hagen F, Kirchmair M, Rainer J, Schwabenbauer K, Zoderer M, Meyer W, Gilgado F, Vicente V, Piecková E, Regenermel M, Rath P-M, Steinmann J, de Alencar X, Symoens F, Tintelnot K, Ulfig K, Velegraki A, Tortorano A, Giraud S, Mina S, Rigler-Hohenwarter K, Hernando F, Ramirez-Garcia A, Pellon A, Kaur J, Bergter E, de Meirelles J, da Silva I, Delhaes L, Alastruey-Izquerdo A, Li R-y, Lu Q, Moussa T, Almaghrabi O, Al-Zahrani H, Okada G, Deng S, Liao W, Zeng J, Issakainen J, Liporagi Lopes L, 2014. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. *Fungal Diversity* **67**: 1–10.

Lamarre C, LeMay JD, Deslauriers N, Bourbonnais Y, 2001. *Candida albicans* expresses an unusual cytoplasmic manganese-containing superoxide dismutase (SOD3 gene product) upon the entry and during the stationary phase. *The Journal of Biological Chemistry* **276**: 43784–43791.

Larcher G, Cimon B, Symoens F, Tronchin G, Chabasse D, Bouchara JP, 1996. A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochemical Journal* **315** (Pt 1): 119–126.

Lima OC, Larcher G, Vandeputte P, Lebouil A, Chabasse D, Simoneau P, Bouchara JP, 2007. Molecular cloning and biochemical characterization of a Cu,Zn-superoxide dismutase from *Scedosporium apiospermum*. *Microbes and Infection* **9**: 558–565.

Livak KJ, Schmittgen TD, 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**: 402–408.

Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W, 2014. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Medical Mycology* **52**: 179–186.

Mina S, Marot-Leblond A, Cimon B, Fleury MJ, Larcher G, Bouchara JP, Robert R, 2015. Purification and characterization of a mycelial catalase from *Scedosporium boydii*, a useful tool for specific antibody detection in patients with cystic fibrosis. *Clinical and Vaccine Immunology* **22**: 37–45.

Morio F, Horeau-Langlard D, Gay-Andrieu F, Talarmin JP, Haloun A, Treilhaud M, Despins P, Jossic F, Nourry L, Danner-Boucher I, Pattier S, Bouchara JP, Le Pape P, Miègeville M, 2010. Disseminated *Scedosporium/Pseudallescheria* infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 1978–1982.

Murphy JW, 1991. Mechanisms of natural resistance to human pathogenic fungi. *Annual Review of Microbiology* **45**: 509–538.

Möller EM, Bahnweg G, Sandermann H, Geiger HH, 1992. A simple and efficient protocol for isolation of high molecular weight DNA from filamentous fungi, fruit bodies, and infected plant tissues. *Nucleic Acids Research* **20**: 6115–6116.

Nathan C, Shiloh MU, 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 8841–8848.

Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, Shibuya K, Philippe B, Diamond RD, Latgé JP, 2003. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **71**: 3551–3562.

Pellon A, Ramirez-Garcia A, Antoran A, Fernandez-Molina JV, Abad-Diaz-de-Cerio A, Montañez D, Sevilla MJ, Rementeria A,

Hernando FL, 2014. *Scedosporium prolificans* immunomes against human salivary immunoglobulin A. *Fungal Biology* **118**: 94–105.
Pereira MM, Silva BA, Pinto MR, Barreto-Bergter E, dos Santos AL, 2009. Proteins and peptidases from conidia and mycelia of *Scedosporium apiospermum* strain HLPB. *Mycopathologia* **167**: 25–30.
Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, Bouchara JP, 2009. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis – a review. *Medical Mycology* **47**: 387–397.
Pinto MR, Rodrigues ML, Travassos LR, Haido RM, Wait R, Barreto-Bergter E, 2002. Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology* **12**: 251–260.
Sahi H, Avery RK, Minai OA, Hall G, Mehta AC, Raina P, Budev M, 2007. *Scedosporium apiospermum* (*Pseudoallescheria boydii*) infection in lung transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **26**: 350–356.
Santos AL, Bittencourt VC, Pinto MR, Silva BA, Barreto-Bergter E, 2009. Biochemical characterization of potential virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. *Medical Mycology* **47**: 375–386.
Sarfati J, Monod M, Recco P, Sulahian A, Pinel C, Candolfi E, Fontaine T, Debeaupuis JP, Tabouret M, Latgé JP, 2006. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **55**: 279–291.
Siebert PD, Chenchik A, Kellogg DE, Lukyanov KA, Lukyanov SA, 1995. An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA. *Nucleic Acids Research* **23**: 1087–1088.
Silva BA, Souza-Gonçalves AL, Pinto MR, Barreto-Bergter E, Santos AL, 2011. Metallopeptidase inhibitors arrest vital biological processes in the fungal pathogen *Scedosporium apiospermum*. *Mycoses* **54**: 105–112.
Storz G, Tartaglia LA, Farr SB, Ames BN, 1990. Bacterial defenses against oxidative stress. *Trends in Genetics* **6**: 363–368.
Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, Denis O, Estenne M, Nolard N, Jacobs F, 2006. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **25**: 603–607.
Tang AC, Turvey SE, Alves MP, Regamey N, Tümmler B, Hartl D, 2014. Current concepts: host-pathogen interactions in cystic fibrosis airways disease. *European Respiratory Review* **23**: 320–332.
Vandeputte P, Ghamrawi S, Rechenmann M, Iltis A, Giraud S, Fleury M, Thornton C, Delhaès L, Meyer W, Papon N, Bouchara JP, 2014. Draft genome sequence of the pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. *Genome Announcements* **2** e00988–14.
Verduyn Lunel FM, Meis JF, Voss A, 1999. Nosocomial fungal infections: candidemia. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **34**: 213–220.
Vázquez-Tsuji O, Campos Rivera T, Rondán Zárate A, Mirabal García M, 2006. Endobronchitis by *Scedosporium apiospermum* in a child with cystic fibrosis. *Revista Iberoamericana de Micología* **23**: 245–248.
Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S, 2013. Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Medical Mycology* **51**: 603–613.

3. Analyse bio-informatique des génomes de *Scedosporium*

Enzymatic mechanisms involved in evasion of fungi to the oxidative stress: focus on *Scedosporium apiospermum*

C. Staerck[1], P. Vandeputte[1,2], A. Gastebois[1], A. Calenda[1], S. Giraud[1], N. Papon[1], J.P. Bouchara[1,2], M.J.J. Fleury[1]

[1]Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), UNIV Angers, UNIV Brest, Université Bretagne-Loire, Angers, France

[2] Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

Publié dans Mycopathologia, le 21 juin 2017

Résumé

Les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose sont fréquemment colonisées par de nombreux champignons, notamment *Aspergillus fumigatus* et les *Scedosporium.* Pour s'établir dans les voies respiratoires et engendrer une infection, les champignons expriment des facteurs de pathogénicité leur permettant d'adhérer aux tissus, de capter le fer extracellulaire, ou de se protéger contre les défenses immunitaires. Au cours de la colonisation, les spores inhalées, puis les hyphes sont soumis à un stress oxydatif généré par la libération d'espèces réactives oxygénées (ERO ou ROS) et azotées (RNS ou ERA) par les phagocytes. Pour se protéger, les champignons ont développé des mécanismes de détoxification mettant notamment en jeu des systèmes enzymatiques. Cette revue résume différents travaux s'étant intéressés aux enzymes de détoxification des ROS/RNS chez les champignons couramment rencontrés dans la mucoviscidose et leur rôle dans la pathogénicité ou leur intérêt pour le sérodiagnostic. La disponibilité du génome de *S. apiospermum* a permis d'identifier les gènes codant des protéines impliquées dans la détoxification des ROS/RNS. Ces données ouvrent de nouvelles perspectives pour la compréhension des mécanismes de pathogénicité des *Scedosporium*, et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mots-clés: *Scedosporium apiospermum,* Mucoviscidose, ROS, RNS, Antioxydants enzymatiques.

Author's personal copy

Mycopathologia
DOI 10.1007/s11046-017-0160-6

Enzymatic Mechanisms Involved in Evasion of Fungi to the Oxidative Stress: Focus on *Scedosporium apiospermum*

C. Staerck · P. Vandeputte · A. Gastebois · A. Calenda · S. Giraud · N. Papon · J. P. Bouchara · M. J. J. Fleury

Received: 1 April 2017 / Accepted: 12 June 2017
© Springer Science+Business Media B.V. 2017

Abstract The airways of patients with cystic fibrosis (CF) are frequently colonized by various filamentous fungi, mainly *Aspergillus fumigatus* and *Scedosporium* species. To establish within the respiratory tract and cause an infection, these opportunistic fungi express pathogenic factors allowing adherence to the host tissues, uptake of extracellular iron, or evasion to the host immune response. During the colonization process, inhaled conidia and the subsequent hyphae are exposed to reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) released by phagocytic cells, which cause in the fungal cells an oxidative stress and a nitrosative stress, respectively. To cope with these constraints, fungal pathogens have developed various mechanisms that protect the fungus against ROS and RNS, including enzymatic antioxidant systems. In this review, we summarize the different works performed on ROS- and RNS-detoxifying enzymes in fungi commonly encountered in the airways of CF patients and highlight their role in pathogenesis of the airway colonization or respiratory infections. The potential of these enzymes as serodiagnostic tools is also emphasized. In addition, taking advantage of the recent availability of the whole genome sequence of *S. apiospermum,* we identified the various genes encoding ROS- and RNS-detoxifying enzymes, which pave the way for future investigations on the role of these enzymes in pathogenesis of these emerging species since they may constitute new therapeutics targets.

Keywords *Scedosporium apiospermum* · Cystic fibrosis · ROS · RNS · Antioxidant enzymes

PV, AG, SG, JPB and MJJF are members of the ECMM/ISHAM (European Confederation of Medical Mycology/International Society for Human and Animal Mycology) working group Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis (Fri-CF).

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s11046-017-0160-6) contains supplementary material, which is available to authorized users.

C. Staerck · P. Vandeputte · A. Gastebois · A. Calenda · S. Giraud · N. Papon · J. P. Bouchara · M. J. J. Fleury (✉)
Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), UNIV Angers, UNIV Brest, Université Bretagne-Loire, Angers, France
e-mail: maxime.fleury@univ-angers.fr

P. Vandeputte · J. P. Bouchara
Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

Respiratory infections determine the quality of life of patients with cystic fibrosis (CF). In the airways, mutations in the gene CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) result in a defective chloride channel and therefore to dehydration and thickening of the bronchial mucus. These abnormal airway conditions allow the entrapment of the inhaled

Published online: 21 June 2017

Author's personal copy

bacteria and fungal spores and provide a suitable environment for growth of microorganisms. Therefore, the CF respiratory tract is often colonized by microorganisms, sometimes leading to respiratory infections which are the major cause of morbidity and mortality in these patients [1].

Although bacteria remain the main cause for these infections, rising focus has been paid to fungal respiratory infections during the past decades because of their growing frequency [2]. Nevertheless, little information is available about the pathogenesis of fungal respiratory infections.

Actually, the fungal colonization of the airways is very rare in young children and usually succeeds to bacterial infections, suggesting that prior bronchopulmonary epithelial tissue lesions induced by these infections are necessary for establishment of the inhaled fungal spores within the respiratory tract. Several secreted bacterial proteases have been characterized which may be responsible for tissue damage. Nevertheless, there is accumulating evidence suggesting that, more than the bacteria themselves, the resulting inflammatory reaction is the major cause of these cellular lesions, because of the release of the leukocyte elastase and of the burst oxidative response and the subsequent release of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) [1, 3, 4].

Size of the inhaled conidia and thermotolerance of the fungus are essential conditions for development in the lung. Nevertheless, to establish in the respiratory tract and to colonize the airways or to cause a respiratory infection, the fungus should be capable to adhere to the host tissues and to acquire the extracellular iron which is required for essential processes in fungal cells like respiration or synthesis of membrane ergosterol, but also to evade the host immune response. This is particularly true in CF which is characterized by an exacerbated inflammatory reaction [3]. Melanin produced in most cases through the dihydroxynaphthalene pathway and the hydrophobins which cover the conidial surface play important roles in protecting the conidia against the host immune defenses [5–10]. Enzymatic mechanisms also contribute to evasion of the fungus to the oxidative and nitrosative stress generated by ROS and RNS released by phagocytic cells.

Scedosporium species which belong to the phylum Ascomycota and to the order Microascales are environmental molds usually living as saprophytes, mainly in highly polluted soils and contaminated water [11–14]. These opportunistic fungi may also cause in human a wide variety of diseases ranging from localized infections such as subcutaneous mycetomas to severe and often fatal disseminated infections in immunocompromised individuals, particularly after lung transplantation [11]. This genus which comprises today ten distinct species, the major in frequency in human or in the environment being *S. apiospermum* sensu stricto, *S. aurantiacum*, *S. boydii*, *S. minutisporum* and *S. dehoogii* [13, 15, 16], has received an increasing attention since the approval by the ISHAM (International Society for Human and Animal Mycology) council in 2006 and later by the council of the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) of the ECMM/ISHAM working group on Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis (Fri-CF) and the worldwide recognition of these fungi as significant pathogens in the CF context. In CF, *Scedosporium* species rank the second among the filamentous fungi colonizing the airways, after *Aspergillus fumigatus,* with a prevalence rate ranging from 3 to 17.4% depending on the studies [17–23]. These fungi, mainly *S. apiospermum, S. boydii* and *S. aurantiacum*, are usually responsible for a chronic colonization of the airways, which has been demonstrated as a risk factor for a disseminated infection in case of lung or heart–lung transplantation [24–27]. However, despite this growing interest, little is known about their pathogenic mechanisms, mainly because of the lack of available genomic resources for a long time.

This review is focused on enzymatic mechanisms implemented by the fungal species associated with CF to degrade ROS and RNS produced by neutrophils and macrophages. Beside their role in pathogenesis, the potential interest of ROS- and RNS-detoxifying enzymes for serodiagnosis or prevention of the infection will be also discussed. Finally, we have taken advantage of the recent availability of the genome sequence of a first strain of *S. apiospermum* sensu stricto (IHEM 14462) [28] to identify the equipment of the fungus for ROS and RNS enzymatic degradation which will be compared to that described for the other fungal species encountered in CF.

Free Radicals, ROS and RNS

ROS are represented principally by the primary free radicals that are superoxide anions ($O_2^{\cdot -}$), which lead

Author's personal copy

to more reactive oxygen species including hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radicals ($OH^{\cdot}$) and hypochloride [29]. RNS are more complex and depend on the local redox environment. The primary RNS is the free radical nitric oxide ($NO^{\cdot}$) which leads to the generation of other RNS, particularly peroxinitrite ($ONOO^{-}$) through the oxidation of nitric oxide in the presence of superoxide anions [30, 31].

ROS and RNS are produced by a wide range of mechanisms including the aerobic metabolism by the mitochondrial respiratory chain, irradiations and metal-catalyzed reactions, or in the presence of pollutants in the environment [32]. They display a dual role in biological systems with a dose-dependent effect. ROS and RNS are essential for several cellular signaling pathways and participate in the regulation of various physiological processes at low levels [31], but are harmful on biological macromolecules at high concentrations [32]. The host immune defenses take advantage of this characteristic since phagocytic cells (macrophages and neutrophils) produce many ROS/RNS in response to pathogens. The recognition of microorganisms through the pattern recognition receptors, mainly dectin 1 and dectin 2, elicits in macrophages and neutrophils an oxidative burst response with the production of superoxide anions through the NADPH oxidase or the oxidation of hypoxanthine or xanthine by the metalloenzyme xanthine oxidase [31, 33]. This oxidative burst response also leads, through the oxidation of arginine in citrulline by an inducible nitric oxide synthase, to the production of nitric oxide which in combination with superoxide anions forms peroxinitrite [31]. Finally, myeloperoxidase which is also present in neutrophils and macrophages, catalyzes the conversion of hydrogen peroxide in hypochlorous acid which is considered as the most reactive oxygen species [30, 31]. Compared to neutrophils, macrophages produce a higher amount of RNS and conversely less ROS [31].

Various molecular mechanisms contribute in preventing the deleterious effects of ROS and RNS on lipids, DNA or proteins, and therefore in preserving cell integrity. These comprise non-enzymatic antioxidant systems (vitamin E, carotenoids, metallothioneins, scavenger of hydroxyl radical, ascorbate and glutathione). A variety of antioxidant enzymes also contribute to the detoxifying process, including superoxide dismutases (SODs) which catalyze dismutation of superoxide anions into hydrogen peroxide, or catalases and proteins of the glutathione or thioredoxin systems which prevent the formation of the highly toxic hydroxyl radicals from H_2O_2 through Fenton reaction. Likewise, scavenging RNS involves NO oxidases which are flavohemoglobins converting the nitric oxide into nitrate which is in turn converted into nitrite and finally in ammonium through the successive action of nitrate and nitrite reductases [31, 34–41]. Human cells exhibit this enzymatic equipment to degrade the superoxide anions formed during the mitochondrial respiration, but pathogens also harbor similar enzymes to scavenge ROS/RNS and thus to evade the host immune response.

The key role of ROS in the defense against respiratory pathogens is illustrated by the frequency of bacterial or fungal respiratory infections in chronic granulomatous disease (CGD) which results from mutations in genes encoding one of the proteins of the mitochondrial NADPH oxidase complex, mainly the $gp91^{Phox}$ gene, leading to a defect in the production of superoxide anions by macrophages and neutrophils [42, 43]. Patients with CGD are prone to chronic respiratory infections, mainly caused by *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia*, *Serratia marcescens* or *Nocardia* species, or some aspergilli including *Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus nidulans* [42–45]. However, more occasionally other fungal pathogens associated with CF may also cause infections in CGD patients, as *Scedosporium* species [46–49], *Lomentospora prolificans* [50], species of the *Rasamsonia argillacea* complex [51, 52] and *Exophiala dermatitidis* [53].

Proteins Implicated in ROS/RNS Degradation and Their Role in Virulence in Fungi

Antioxidant enzymes have been extensively studied in yeasts, especially in *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Cryptococcus neoformans*. Conversely, few data are available on the enzymatic degradation of ROS or RNS in filamentous fungi and they mainly deal with *Aspergillus* species.

Although the clinical relevance of the isolation of *C. albicans* from respiratory secretions still remains a matter of debate, colonization of the airways by this yeast is particularly frequent in patients with CF, with a

Author's personal copy

prevalence rate ranging from 38 to nearly 50% of the patients [54, 55]. In this yeast, eight genes involved in ROS degradation were reported to play a role in virulence. Deletion of *SOD1* or *SOD5* genes resulted in a reduced virulence in a mouse model [56–58]. Likewise, genes encoding the glutathione reductase 1 (*GLR1*) and the S-nitrosoglutathione reductase (*FDH3*) were also demonstrated to be involved in virulence in the *Galleria mellonella* model (an invertebrate host model), but deletion of the latter was not associated with a decreased virulence in mice, suggesting differences in NO production between these two animal models [59]. Mutants defective in the glutaredoxin 2 (*GRX2*) displayed an attenuated virulence in a murine model of systemic infection, associated with a defect in hyphal growth and an increased susceptibility to macrophages and neutrophils [57, 60].

Proteins of the thioredoxin system also play an important role in protecting the fungal cells against the oxidative attack. *Candida albicans* mutants defective in the thioredoxin (*TRX1*) gene showed an attenuated virulence in mice [61]. Likewise, the thioredoxin reductase *TRR1* gene (also called *CaTrxR*) was shown to be highly expressed in oxidative stress conditions and to contribute to virulence in a mouse model [62]. The encoded protein *Ca*TrxRp has been used in challenge experiments against disseminated candidiasis. *Ca*TrxRp-immunized mice developed specific antibodies which partially protected them against *C. albicans* infection, suggesting that this protein may be a suitable antigen for vaccination strategies [63]. Since fungal-type thioredoxin reductase homologs are absent in human, this protein was also proposed as a drug target for drug development [64]. Finally, a reduced virulence has also been reported for mutants defective in the flavohemoglobin *YHB1* [65] and administration of the Mn-superoxide dismutase Sod2p with adjuvant to mice induced a mucosal immunity effective in clearing yeasts and in protecting the animals from the infection [66].

Exophiala dermatitidis is another example of the role of detoxifying enzymes in evasion to the host immune response. This fungus is a dimorphic fungus which belongs to the Eurotiomycetes and to the order Chaetothyriales. It grows as a filamentous fungus at room temperature, but produces at 37 °C brown to black yeast-like colonies and therefore belongs to the so-called black yeasts. This fungus originating from the rain tropical forest was introduced only recently in Europe. The first cases of its recovery from respiratory secretions of CF patients have been reported in Germany in the 1990s [67]. To date, the fungus has been reported in the CF context in other European countries like Ireland [68] or Belgium [69]. Nevertheless, it remains relatively uncommon in CF, except in Sweden where a prevalence rate of 19% has been reported by Kondori et al. [70]. In the environment as well as in the CF airways, this highly melanized fungus is exposed to many oxidative stresses. Melanin of the cell wall plays a key role in protecting the cells against ionizing radiations and oxygen radicals. However, detoxifying enzymes also contribute to evasion of fungal cells to the oxidative stress. Recently a transcriptomic analysis permitted to identify 13 genes that are overexpressed in response to the oxidative stress, particularly genes encoding alpha aminoadipate reductase, an aldehyde reductase and phytoene dehydrogenase, but also two genes encoding glutathione reductases (GenBank accession numbers ORF06208 and ORF04629) as well as genes encoding the catalase A *CTT1* (ORF01314) and the Fe/Mn-superoxide dismutase *SOD2* (ORF08836) [71].

Compared to yeasts, filamentous fungi have been less studied due to the difficulty to generate defective mutants. In *A. fumigatus*, two catalase genes, *CAT1* and *CAT2*, were shown to contribute to the evasion of the fungus to the oxidative stress [72]. However, virulence in animal models was not attenuated in single or multiple mutants for catalase genes [72, 73]. The lack of reduction in virulence in these mutants may be explained by compensatory mechanisms involving the glutathione and/or thioredoxin systems that could also detoxify the hydrogen peroxide. Another example of the redundancy of antioxidant systems in *A. fumigatus* is provided by the lack of changes in the survival of the fungus in vivo after deletion of the gene encoding the thioredoxin Asp f 29, but analysis of *A. fumigatus* genome revealed the presence of five putative thioredoxins [74]. Likewise, the cytosolic superoxide dismutases Sod1p and Sod3p, as well as thioredoxin, were suggested to play the predominant role against the oxidative stress, in protecting the hyphae both in vitro and in vivo in mice models of corneal infection. Particularly, inhibition of fungal thioredoxin by the thioredoxin inhibitor PX-12 was shown to increase the susceptibility of the fungus to hydrogen peroxide and to the neutrophil-mediated killing in vitro, and to protect mice against

Author's personal copy

the infection by topical applications on the cornea [74]. Nevertheless, other studies showed that the gene encoding the allergen Asp f 3 (peroxiredoxin), which is highly induced after exposure to hydrogen peroxide, contributes to protection against the oxidative stress [75, 76] and to virulence in a murine model of aspergillosis [75]. Asp f 3 could be a powerful vaccine against invasive aspergillosis as demonstrated by the survival of 65% of mice immunized with rAsp f 3 in the presence of TiterMax adjuvant [75, 77, 78].

Very few information is available regarding the role of fungal RNS-detoxifying enzymes in virulence. In *C. albicans*, the deletion of the flavohemoglobin gene *YHB1*, which is overexpressed in the presence of NO, resulted in hypersensitivity to nitric oxide. Nevertheless, virulence in a mouse model of disseminated candidiasis was only moderately attenuated by disruption of this gene [79, 80]. As for *A. fumigatus,* two flavohemoglobins have been described, a cytoplasmic protein encoded by the *FhpA* gene and a mitochondrial one encoded by *FhpB*. The corresponding protein FhpAp had no protective role against killing by alveolar mouse macrophages, and disruption of the gene *FhpA* did not affect virulence in a mouse model of invasive pulmonary aspergillosis using cortisone acetate as the immunosuppressant [81]. Likewise the double mutant Δ*FhpA*/Δ*FhpB* showed similar virulence in the *Galleria* model than the wild-type strain [81].

Scedosporium apiospermum Gene Equipment for ROS- and RNS-Detoxification

Based on the important role of ROS-detoxifying enzymes in virulence of various fungal pathogens and their utility for serodiagnosis of fungal infections, a greater attention should be paid to these enzymes in *Scedosporium* species. Very little information is available on this topic due to our lack of genomic resources and the absence of efficient tools for gene disruption in these fungi. The recent availability of the whole genome sequence of a first strain of *S. apiospermum* sensu stricto [28] provides a major opportunity for future investigations in this topic. Recently, the genomes of *S. aurantiacum* [82] and *S. boydii* were also sequenced. Nevertheless, *S. aurantiacum* genome is not annotated and sequence data are not publicly available for *S. boydii*. A bioinformatic analysis was thus conducted on *S. apiospermum* genome which allowed us to identify 33 genes encoding proteins with high sequence homologies with some previously characterized fungal ROS- or RNS-detoxifying enzymes (Fig. 1). In supplemental table are presented for each of the genes identified in *S. apiospermum* genome, the five fungal species producing homologous proteins with the highest identity rate. Although the other fungal species associated with CF may produce homologous proteins, they always exhibited lower identity rates, and therefore, they are not indicated in this table.

For instance, in the draft genome sequence, seven genes were annotated as encoding SODs, four corresponding to cytosolic Cu/Zn-SODs (SAPIO_CDS 2117, SAPIO_CDS3212, SAPIO_CDS4327 and SAPIO_CDS7433) (Fig. 2) and three encoding mitochondrial Mn-SODs (SAPIO_CDS3426, SAPIO_CD S6474 and SAPIO_CDS8679) (Supplemental table and Supplemental figure A). The four genes presented in Fig. 2 exhibited the classical domain of Cu/Zn-SODs and one or two P-class dimer interface sites necessary for the dimeric (cytoplasmic or periplasmic SODs) or tetrameric (extracellular SODs) assembly of the encoded protein. A peptide signal required for secretion was found in the protein sequence deduced from SAPIO_CDS4327 and SAPIO_CDS3212 genes (Fig. 2). The protein encoded by SAPIO_CDS3212, which also exhibited a GPI (glycosylphosphatidylinositol) anchor (Fig. 2), was demonstrated as specifically expressed at the surface of resting conidia in a proteomic study of the GPI-anchored cell wall proteins and their changes with germination of the conidia in *S. boydii* [83]. Further studies should be conducted on this protein because of its presence at the conidial surface which is the infecting form of the fungus and which is the first to be faced to the host immune defenses. Additionally, the cytosolic Cu/Zn-SOD encoded by gene SAPIO_CDS 7433 (KEZ41328) corresponds to the cytosolic Cu/ZN-SOD previously purified form the mycelial extract and referred to as SODCp [84]. In addition, a heavy-metal-associated (HMA) domain was also found in one of the corresponding proteins (KEZ45313 encoded by SAPIO_CDS2317). This HMA domain consists in approximately 30 amino acids residues, including two cysteinyl residues which are important in binding and transfer of heavy metals such as Cu, Zn, Cd and Co. Strikingly, about 7000 bp upstream this gene, is another gene (SAPIO_CDS2115) encoding an

Author's personal copy

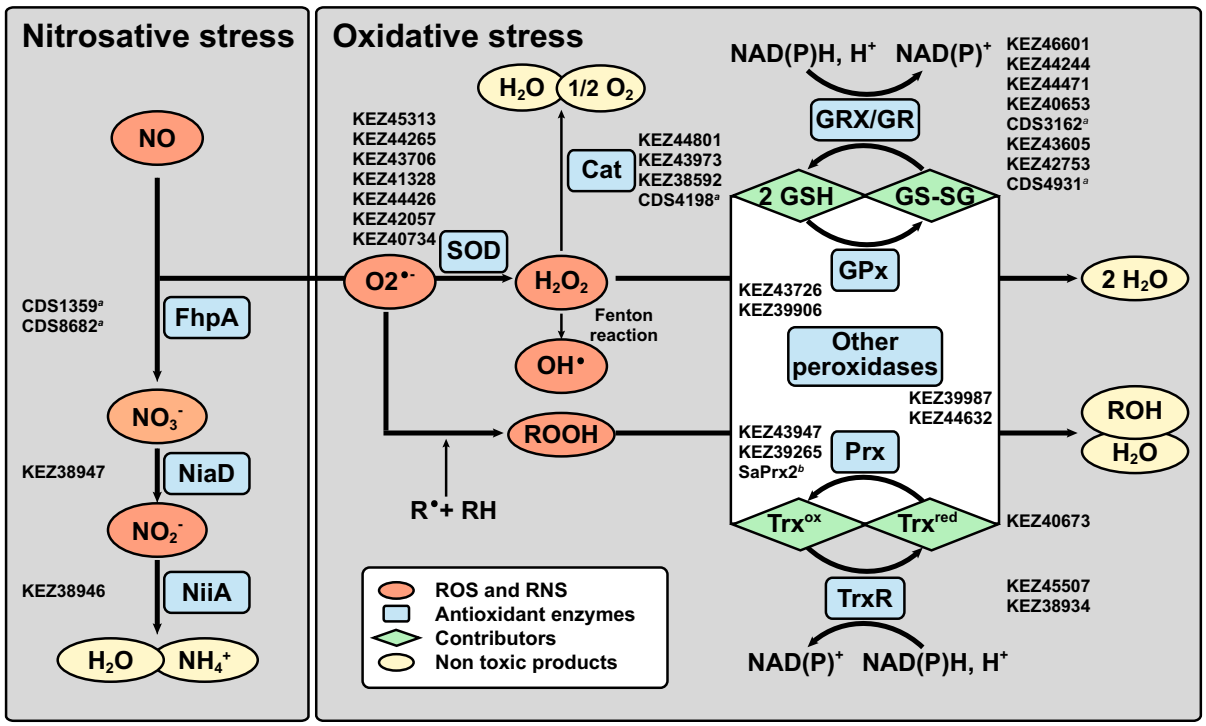


Fig. 1 Enzymatic degradation of ROS and RNS by *Scedosporium apiospermum*. *SOD* superoxide dismutase, *CAT* catalase, *GPx* glutathione peroxidase, *Grx* glutaredoxine, *GR* glutathione reductase, *GSH* reduced glutathione, *GSSG* oxidized glutathione, *CCP* cytochrome C peroxidase, *CPO* chloride peroxidase, *Prx* peroxiredoxin or thioredoxin peroxidase, *TrxR* thioredoxin reductase, *Trx red* reduced thioredoxin, *Trx ox* oxidized thioredoxine, *FhpA* flavohemoglobin, *NiaD* nitrate reductase, *NiiA* nitrite reductase, $O_2^{\bullet-}$ superoxide anion, H_2O_2 hydrogen peroxide, $OH^{\bullet}$: hydroxyl radical, *ROOH* hydroperoxide radical, *ROH* alcohol, *NO* nitric oxide, NO_3^- nitrate, NO_2^- nitrite, NH_4^+ ammonium, $R^{\bullet}$ radicals centered on the carbon. GenBank accession number of the enzymes is indicated, apart from: [a]open reading frames annotated as pseudogenes which are indicated by the accession number of the coding sequence; and [b]SaPrx2 which was not identified as a coding sequence in the draft genome sequence of *S. apiospermum*

ortholog of NAPDH oxidase regulator in many fungal species.

Three genes encoding catalases (SAPIO_CDS2912, SAPIO_CDS4185 and SAPIO_CDS10583) were also found in the *S. apiospermum* genome (Fig. 3; Supplemental table) which is in agreement with previous results obtained in *S. boydii* for which three catalases (A1, A2 and A2′) were detected from mycelial extracts [85]. Three types of catalases are described, including typical catalases which are homotetrameric heme proteins (with a minor subgroup corresponding to large catalases possessing an extra flavodoxin-like C-terminal domain), bifunctional catalase peroxidases which are also heme proteins though to have evolved via gene duplication from an ancestral peroxidase gene, and manganese catalases [86]. Analysis of the deduced protein sequence from the three *S. apiospermum* genes revealed similar domain organization for two of these proteins. KEZ44801 (SAPIO_CDS2912) and KEZ43973 (SAPIO_CDS4185) exhibit a core catalase domain (containing the heme binding pocket) and a catalase immune responsive domain and are therefore typical monofunctional catalases. Nevertheless, an extra glutamine amidotransferase (GAT)-class I domain which is topologically similar to the flavodoxin-like domain [87] was found at the C terminus of the derived protein, thus classifying this protein in the subgroup of large catalases. Interestingly, a peptide signal was found in only one of the deduced protein sequences (KEZ44801), and accordingly among the three catalases detected from *S. boydii* mycelial extract, a unique protein, catalase A1, was found in the culture filtrate and was therefore secreted by the fungus [85]. Finally, protein encoded by the third gene (KEZ38592) is also an heme protein, but exhibiting

Author's personal copy

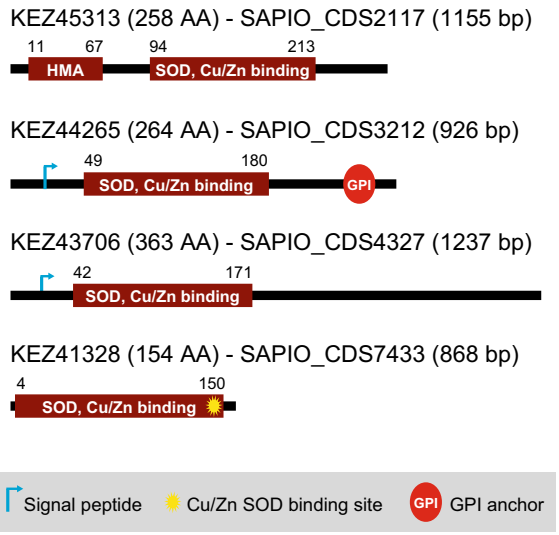


Fig. 2 Domain organization of Cu/Zn superoxide dismutase genes identified in *Scedosporium apiospermum* genome. *SOD* superoxide dismutase, *GPI* glycosylphosphatidylinositol, *AA* amino acids. GenBank accession number of the genes (with the prefix SAPIO_CDS) is indicated together with the accession number of the encoded proteins (KEZ numbers)

both the typical N-terminal catalytic domain of catalase peroxidase (with the peroxidase active site and the peroxidase heme binding site) and the typical C-terminal non-catalytic domain of catalase peroxidase. Nevertheless, previous studies on *S. boydii* failed to detect a peroxidase activity for either the three enzymes [85]. In addition, a further analysis of *S. apiospermum* genome allowed the identification of a supplementary gene (SAPIO_CDS4198) which was not initially annotated in the draft genome sequence of *S. apiospermum* sensu stricto. The deduced protein sequence displays the domain organization and characteristic sites of catalase peroxidases. Interestingly, while sharing strong homologies (68%, with a query cover of 85%) with SAPIO_CDS10583, SAPIO_CDS4198 did not exhibit the intron found in SAPIO_CDS10583. It may be hypothesized that the SAPIO_CDS4198 gene could have arisen from a recent gene duplication and rearrangement event of SAPIO_CDS10583, as often observed during evolution of the Ascomycetes [88].

The genome of *S. apiospermum* also comprises two genes encoding glutathione peroxidases (SAPIO_CDS 4353 and SAPIO_CDS8864) and a single gene for a glutathione reductase (SAPIO_CDS6039) (Supplemental table and Supplemental figure B). Further bioinformatics analysis of the genome sequence revealed two supplementary genes encoding glutathione reductases (SAPIO_CDS4534 and SAPIO_CDS4931) (Supplemental table and Supplemental figure B). Because of the prominent role of glutathione

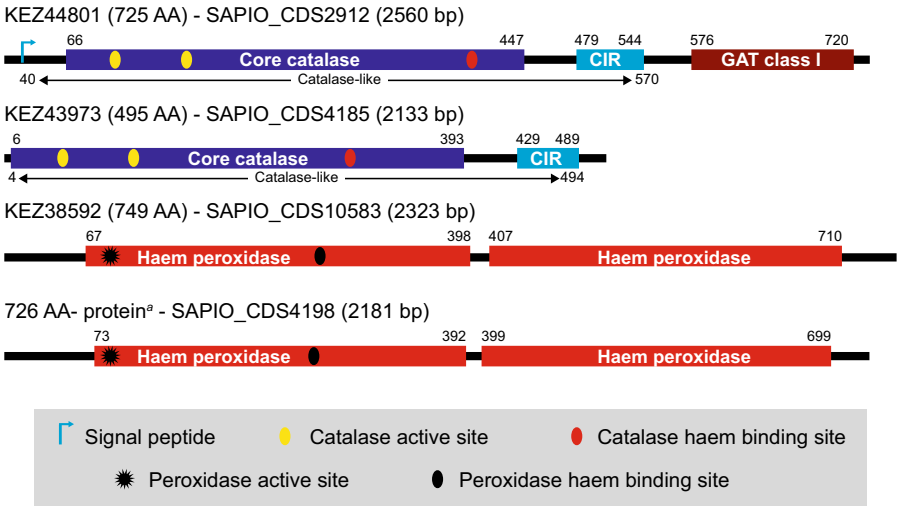


Fig. 3 Domain organization of the catalase genes identified in *Scedosporium apiospermum* genome. *CIR* catalase immune responsive, *GAT* glutamine amidotransferase-like domain, *AA* amino acids. GenBank accession number of the genes (with the prefix SAPIO_CDS) is indicated together with the accession number of the encoded proteins (KEZ numbers). [a]Identified as pseudogene in the draft genome of *S. apiospermum* (likely because of the lack of introns), but a BLASTx analysis (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) revealed high sequence homologies with numerous proteins annotated as catalase in other fungal genomes

Author's personal copy

reductases in virulence in other fungal pathogens like *C. albicans*, a particular attention should be paid in the future on the role of these proteins in pathogenesis of *Scedosporium* infections.

Four genes encoding glutaredoxins (SAPIO_CDS0416, SAPIO_CDS3187, SAPIO_CDS3482 and SAPIO_CDS8578) were also found in the genome of *S. apiospermum* (Supplemental table and Supplemental figure B). Noteworthy, the last one encoded a monothiol glutaredoxin since the deduced protein displayed the glutaredoxin and thioredoxin-like fold domain characteristic of this protein family. Further analysis revealed the presence of an additional gene (SAPIO_CDS3162) encoding a protein with the canonical domain of monothiol glutaredoxin. The deduced protein sequence is highly homologous to that deduced from SAPIO_CDS8578, but the lack of the intron typically found in other monothiol glutaredoxin genes also suggests a recent gene duplication to be at the origin of this additional gene.

Two genes encoding peroxiredoxins (PRX) (SAPIO_CDS4142 and SAPIO_CDS9937) are annotated in the genome of *S. apiospermum* sensu stricto (Supplemental table and Supplemental figure C), but a nucleotide sequence (not considered as an open reading frame in the draft genome) putatively encoding a peroxiredoxin (here named SaPrx2) was also found. The deduced protein sequence exhibited a motif characteristic of the peroxiredoxin-like family. In addition, two genes encoding thioredoxin reductases (SAPIO_CDS1830 and SAPIO_CDS10274) and a single gene encoding thioredoxin (Trx) (SAPIO_CDS8608) were identified (Supplemental table and Supplemental figure D). Further investigations should be conducted on the corresponding proteins since they play a major role in pathogenesis of other fungal species, as suggested by the antifungal activity of the thioredoxin reductase inhibitor auranofin on *C. albicans* [89] or of the thioredoxin inhibitor PX-12 on *A. fumigatus* [74].

Finally, other peroxidase genes putatively involved in the oxidative stress response were identified the genome of *S. apiospermum.* This includes the cytochrome C peroxidase (CCP) (SAPIO_CDS3675) which reduces the hydroperoxide [90–92] and the chloroperoxidase (CPO) (SAPIO_CDS8967) which catalyzes the reduction of organic hydroperoxide [93, 94] (Supplementary table and Supplemental figure E).

Scedosporium apiospermum genome also harbors genes encoding putative RNS-detoxifying enzymes such as flavohemoglobins and nitrate and nitrite reductases. Among nucleotide sequences considered as pseudogenes if the draft genome, bioinformatic analysis led to the identification of two flavohemoglobin genes, SAPIO_CDS1359 and SAPIO_CDS8682, which are devoid of introns. Analysis of the deduced protein sequences showed the presence of all domains usually found in flavohemoglobins including globin-like, globin/protoglobin, globin, riboflavin synthase-like beta barrel, ferredoxin reductase type FAD binding, oxidoreductase FAD binding and oxidoreductase FAD/NAD(P) binding domains. The genome also comprises two genes, SAPIO_CDS10293 and SAPIO_CDS10292, encoding nitrate and nitrite reductases, respectively (Supplementary table and Supplemental figure F). As it occurs for other fungal species, nitrate and nitrite reductase genes are organized in cluster together with a gene encoding a nitrate/nitrite transporter of the major facilitator superfamily (SAPIO_CDS10291) [95–97] (Fig. 4; Supplemental table). Strikingly, an additional gene (SAPIO_CDS10290) was found close to the *S. apiospermum* cluster but without ortholog in the *Aspergillus* nitrate cluster. Analysis of the deduced protein sequence revealed that this gene encodes a protein sharing high similarities with proteins of the protoglobin family which exhibit apolar tunnels allowing the access of oxygen and NO to the heme distal site and act as NO sensors [98].

Comparison of the *S. apiospermum* gene equipment for ROS- and RNS-detoxification with previously sequenced fungal species associated with cystic fibrosis (*S. aurantiacum, A. fumigatus, A. terreus, C. albicans* and *E. dermatitidis*) revealed a great diversity in the various antioxidant systems (Table 1). Interestingly, compared to the aspergilli, *Scedosporium* species exhibit a higher number of genes encoding members of the glutathione system, and in contrast a lower series of genes involved in the thioredoxin system. Intriguingly, *Exophiala dermatitidis* and *Aspergillus* species seem to be devoid of genes encoding chloroperoxidase.

A BLAST search for homologous proteins was also conducted on all the deduced protein sequences putatively involved in ROS- and RNS-detoxification in *S. apiospermum* (Supplemental table). Whereas two other genomes are fully annotated in the Microascales

Author's personal copy

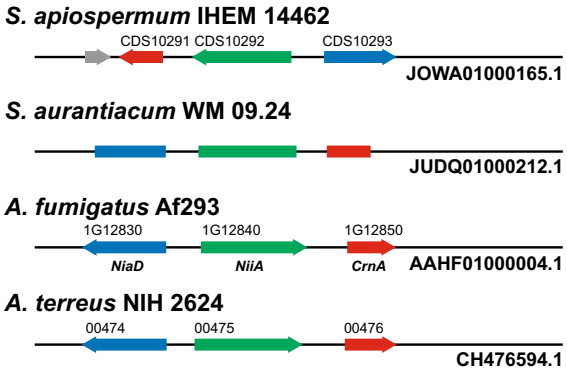


Fig. 4 Comparison of the nitrate/nitrite reductase gene cluster in four filamentous fungi encountered in CF, *Scedosporium apiospermum* sensu stricto, *Scedosporium aurantiacum, Aspergillus fumigatus* and *Aspergillus terreus. Red arrow* identifies nitrate transporter, *blue arrow* the nitrate reductase and *green arrow* the nitrite reductase. The GenBank accession number of the contig (or chromosome for *A. fumigatus*) is indicated under the *solid black line* representing the contig (or chromosome), and the accession number of the genes (with the prefix SAPIO_CDS for *S. apiospermum*, AFUA_ for *A. fumigatus* and ATEG_ for *A. terreus*) is indicated above the corresponding genes. As *S. aurantiacum* is not annotated, orthologs of *S. apiospermum* were identified by BLASTn analysis. An additional gene is presented in gray for *S. apiospermum*, SAPIO_CDS10290, encoding a putative NO sensor

order, *Thielaviopsis punctulata* and *Ceratocystis platani*, the closest homologous proteins were found in these fungi for only one of the *S. apiospermum* genes. For most of the genes studied, the highest identity rates were found for homologous proteins from other Hypocreomycetidae, particularly *Colletotrichum*, *Fusarium* or *Metarhizium* species. Intriguingly, the highest identity rates were observed for 8 out of these 33 genes with proteins from some Eurotiomycetes, and for one gene with proteins from several Onygenales, more precisely the human pathogenic fungi *Emmonsia parva*, *Histoplasma capsulatum* or *Blastomyces* species.

Conclusion

In conclusion, the role of ROS- and RNS-detoxifying enzymes in pathogenesis is now well established for some fungal species. Regarding *Scedosporium* species, our knowledge on the mechanisms of protection against the host immune defenses is still limited. The availability of the whole genome sequence of *S. apiospermum* allowed us to identify 33 genes potentially encoding for such enzymes. Attention should be paid on these genes to determine the role of these enzymes in evasion to the oxidative stress of *Scedosporium* species and in their pathogenesis, particularly in the CF context, since it could allow the identification of new therapeutics targets.

Additionally, ROS-detoxifying enzymes may be useful to improve the serodiagnosis of *Scedosporium* infections. Very early, catalases and SODs have been

Table 1 Gene equipment for ROS- and RNS-detoxifying enzymes in fungi associated with cystic fibrosis

	SODs		Cat	Glutathione system			Thioredoxin system			CCP	CPO	FhpA	NiaD	NiiA
	Cu/Zn-SOD	Mn-SOD		GPx	GR	Grx	Prx	TrxR	Trx					
Scedosporium apiospermum IHEM 14462	4	3	4	2	3	5	3	2	1	1	1	2	1	1
Scedosporium aurantiacum WM 09.24	4	3	4	1	2	5	3	2	1	1	1	2	1	1
Candida albicans SC5314	4	2	1	1	1	7	4	1	2	1	3	3	1	0
Exophiala dermatitidis NIH/UT 8656	3	3	4	1	1	3	5	3	2	1	0	1	2	0
Aspergillus fumigatus Af 293	3	3	5	1	1	4	6	3	5	2	0	2	2	1
Aspergillus terreus NIH 2624	4	3	5	1	1	4	2	4	2	2	0	2	1	1

Only genes annotated as encoding such ROS- or RNS-detoxifying enzymes in the GenBank database are presented here

SOD superoxide dismutases, *Cat* catalases, *GPX* glutathione peroxidase, *GR* glutathione reductase, *Grx* glutaredoxins, *Prx* peroxiredoxins, *TrxR* thioredoxin reductases, *Trx* thioredoxins, *CCP* cytochrome C peroxidase, *CPO* chloroperoxidases, *FhpA* flavohemoglobin, *NiaD* nitrate reductase, *NiiA* nitrite reductase

Author's personal copy

demonstrated as valuable antigens for serodiagnosis of *Aspergillus* infections [99–102]. Purification of the native proteins from fungal cultures, however, limits their use due to variations in the production level and in the purity of antigens. Recombinant proteins therefore were produced derived from various antigens or allergens of *A. fumigatus*, including catalase 1 (rCat1), as well as a Cu/Zn-SOD and a mitochondrial Mn-SOD (named SOD3p or Asp f 6), and their reactivity was tested against sera from patients with various *A. fumigatus* infections [103–106]. Some of these recombinant proteins were found to promising tools for serodiagnosis of *Aspergillus* infections, allowing the differentiation between aspergilloma, allergic broncho-pulmonary aspergillosis and sensitization. Accordingly, catalase A1 from *S. boydii,* which corresponds to the ortholog of *A. fumigatus* catalase 1, was recently purified and the purified enzyme was used to develop an ELISA assay with high sensitivity and specificity for *Scedosporium* infections and particularly no cross reactions with an *Aspergillus* infection [85, 107]. Works are in progress to produce a recombinant protein and to evaluate its value for serodiagnosis of scedosporiosis.

Acknowledgements Cindy Staerck was recipient of the French association against cystic fibrosis *Vaincre la Mucoviscidose* (RF20140501104).

References

1. Elborn JS. Cystic fibrosis. Lancet. 2016;388:2519–31.
2. Horré R, Symoens F, Delhaes L, Bouchara JP. Fungal respiratory infections in cystic fibrosis: a growing problem. Med Mycol. 2010;48(Suppl 1):S1–3.
3. Galli F, Battistoni A, Gambari R, et al. Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. Biochim Biophys Acta. 2012;1822:690–713.
4. Reid DW, Misso N, Aggarwal S, Thompson PJ, Walters EH. Oxidative stress and lipid-derived inflammatory mediators during acute exacerbations of cystic fibrosis. Respirology. 2007;12:63–9.
5. Thywißen A, Heinekamp T, Dahse HM, et al. Conidial dihydroxynaphthalene melanin of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus* interferes with the host endocytosis pathway. Front Microbiol. 2011;2:96.
6. Carrion Sde J, Leal SM, Ghannoum MA, Aimanianda V, Latgé JP, Pearlman E. The RodA hydrophobin on *Aspergillus fumigatus* spores masks dectin-1- and dectin-2-dependent responses and enhances fungal survival in vivo. J Immunol. 2013;191:2581–8.
7. Amin S, Thywissen A, Heinekamp T, Saluz HP, Brakhage AA. Melanin dependent survival of *Aspergillus fumigatus* conidia in lung epithelial cells. Int J Med Microbiol. 2014;304:626–36.
8. Bayry J, Beaussart A, Dufrêne YF, et al. Surface structure characterization of *Aspergillus fumigatus* conidia mutated in the melanin synthesis pathway and their human cellular immune response. Infect Immun. 2014;82:3141–53.
9. Chotirmall SH, Mirkovic B, Lavelle GM, McElvaney NG. Immunoevasive *Aspergillus* virulence factors. Mycopathologia. 2014;178:363–70.
10. Rambach G, Blum G, Latgé J-P, et al. Identification of *Aspergillus fumigatus* surface components that mediate interaction of conidia and hyphae with human platelets. J Infect Dis. 2015;212:1140–9.
11. Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, et al. Infections caused by *Scedosporium* spp. Clin Microbiol Rev. 2008; 21:157–97.
12. Harun A, Gilgado F, Chen SC, Meyer W. Abundance of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways in cystic fibrosis. Med Mycol. 2010;48(Suppl 1):S70–6.
13. Lackner M, de Hoog GS, Yang L, et al. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria, Scedosporium* and related genera. Fungal Divers. 2014;67:1–10.
14. Rougeron A, Schuliar G, Leto J, et al. Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* species complex. Environ Microbiol. 2015;17:1039–48.
15. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. J Clin Microbiol. 2005;43:4930–42.
16. Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. J Clin Microbiol. 2008;46:766–71.
17. Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, et al. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2000;19:53–6.
18. Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, et al. Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2002;40:2108–14.
19. Pihet M, Carrère J, Cimon B, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis—a review. Med Mycol. 2008; 47:387–97.
20. Horré R, Marklein G. Isolation and clinical significance of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species. Med Mycol. 2009;47:415–21.
21. Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Nidermajer S, Reiffert SM. Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients. Respiration. 2009;77:320–4.
22. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, et al. Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? Med Mycol. 2010;48(Suppl 1):S37–44.
23. Blyth CC, Harun A, Middleton PG, et al. Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. J Clin Microbiol. 2010;48:314–6.

Author's personal copy

24. Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, et al. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. J Heart Lung Transpl. 2006;25:603–7.
25. Sahi H, Avery RK, Minai OA, et al. *Scedosporium apiospermum (Pseudallescheria boydii)* infection in lung transplant recipients. J Heart Lung Transpl. 2007;26:350–6.
26. Balandin B, Aguilar M, Sánchez I, et al. *Scedosporium apiospermum* and *S prolificans* mixed disseminated infection in a lung transplant recipient: an unusual case of long-term survival with combined systemic and local antifungal therapy in intensive care unit. Med Mycol Case Rep. 2016;11:53–6.
27. Peghin M, Monforte V, Martin-Gomez MT, et al. Epidemiology of invasive respiratory disease caused by emerging non-*Aspergillus* molds in lung transplant recipients. Transpl Infect Dis. 2016;18:70–8.
28. Vandeputte P, Ghamrawi S, Rechenmann M, et al. Draft genome sequence of the pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. Genome Announc. 2014;2:e00988-14.
29. Davies KJA. Oxidative stress: the paradox of aerobic life. Biochem Soc Symp. 1995;61:1–31.
30. Nathan C, Shiloh MU. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. Proc Natl Acad Sci USA. 2000;97:8841–8.
31. Fang FC. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. Nat Rev Microbiol. 2004;2:820–32.
32. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Int J Biochem Cell Biol. 2007;39:44–84.
33. Delattre J, Beaudeux J-L, Bonnefont-Rousselot D. Radicaux libres et stress oxydant: aspects biologiques et pathologiques. Lavoisier. 2007:548.
34. Lancaster JR, Vega JM, Kamin H, et al. Identification of the iron-sulfur center of spinach ferredoxin-nitrite reductase as a tetranuclear center, and preliminary EPR studies of mechanism. J Biol Chem. 1979;254:1268–72.
35. Prodouz KN, Garrett RH. *Neurospora crassa* NAD(P)H-nitrite reductase. Studies on its composition and structure. J Biol Chem. 1981;256:9711–7.
36. Hall N, Tomsett AB. Structure-function analysis of NADPH:nitrate reductase from *Aspergillus nidulans*: analysis of altered pyridine nucleotide specificity in vivo. Microbiology. 2000;146:1399–406.
37. Belozerskaya TA, Gessler NN. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: a review. Appl Biochem Microbiol. 2007;43:506–15.
38. Gessler NN, Aver'yanov AA, Belozerskaya TA. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. Biochem. 2007;72:1091–109.
39. Forrester MT, Eyler CE, Rich JN. Bacterial flavohemoglobin: a molecular tool to probe mammalian nitric oxide biology. Biotechniques. 2011;50:41–5.
40. Forrester MT, Foster MW. Protection from nitrosative stress: a central role for microbial flavohemoglobin. Free Radic Biol Med. 2012;52:1620–33.
41. Marcos AT, Ramos MS, Marcos JF, et al. Nitric oxide synthesis by nitrate reductase is regulated during development in *Aspergillus*. Mol Microbiol. 2016;99:15–33.
42. Goldblatt D. Recent advances in chronic granulomatous disease. J Infect. 2014;69:S32–5.
43. Buvelot H, Posfay-Barbe KM, Linder P, Schrenzel J, Krause KH. *Staphylococcus aureus*, phagocyte NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. FEMS Microbiol Rev. 2017;41:139–57.
44. Winkelstein JA, Marino MC, Johnston RB, et al. Chronic granulomatous disease. Report on a national registry of 368 patients. Medicine (Baltimore). 2000;79:155–69.
45. Henriet SSV, Verweij PE, Warris A. *Aspergillus nidulans* and chronic granulomatous disease: a unique host-pathogen interaction. J Infect Dis. 2012;206:1128–37.
46. Jabado N, Casanova JL, Haddad E, et al. Invasive pulmonary infection due to *Scedosporium apiospermum* in two children with chronic granulomatous disease. Clin Infect Dis. 1998;27:1437–41.
47. Santos PE, Oleastro M, Galicchio M, Zelazko M. Fungal infections in paediatric patients with chronic granulomatous disease. Rev Iberoam Micol. 2000;17:6–9.
48. Gompels MM, Bethune CA, Jackson G, Spickett GP. *Scedosporium apiospermum* in chronic granulomatous disease treated with an HLA matched bone marrow transplant. J Clin Pathol. 2002;55:784–6.
49. Parta M, Hilligoss D, Kelly C, et al. Haploidentical hematopoietic cell transplantation with post-transplant cyclophosphamide in a patient with chronic granulomatous disease and active infection: a first report. J Clin Immunol. 2015;35:675–80.
50. Bhat SV, Paterson DL, Rinaldi MG, Veldkamp PJ. *Scedosporium prolificans* brain abscess in a patient with chronic granulomatous disease: successful combination therapy with voriconazole and terbinafine. Scand J Infect Dis. 2007;39:87–90.
51. Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, et al. *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2010;48:2381–6.
52. Ishiwada N, Takeshita K, Yaguchi T, et al. The first case of invasive mixed-mold infections due to *Emericella nidulans* var. *echinulata* and *Rasamsonia piperina* in a patient with chronic granulomatous disease. Mycopathologia. 2016;181:305–9.
53. Kenney RT, Kwon-Chung KJ, Waytes AT, et al. Successful treatment of systemic *Exophiala dermatitidis* infection in a patient with chronic granulomatous disease. Clin Infect Dis. 1992;14:235–42.
54. Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, et al. Sputum *Candida albicans* presages FEV decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. Chest. 2010;138:1186–95.
55. Ziesing S, Suerbaum S, Sedlacek L. Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. Med Mycol. 2016;54:781–6.
56. Hwang C-S, Rhie G, Oh J-H, et al. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. Microbiology. 2002;148:3705–13.
57. Chaves GM, da Silva WP. Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione and diamide. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2012;107:998–1005.

Author's personal copy

58. Gleason JE, Galaleldeen A, Peterson RL, et al. *Candida albicans* SOD5 represents the prototype of an unprecedented class of Cu-only superoxide dismutases required for pathogen defense. Proc Natl Acad Sci USA. 2014;111:5866–71.
59. Tillmann AT, Strijbis K, Cameron G, et al. Contribution of Fdh3 and Glr1 to glutathione redox state, stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. PLoS ONE. 2015;10: e0126940.
60. Chaves GM, Bates S, Maccallum DM, Odds FC. *Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. Genet Mol Res. 2007;6:1051–63.
61. da Silva Dantas A, Patterson MJ, Smith DA, et al. Thioredoxin regulates multiple hydrogen peroxide-induced signaling pathways in *Candida albicans*. Mol Cell Biol. 2010;30:4550–63.
62. Zaki N, Bakar F, Mahadi N, Murad A. *Candida albicans* TRR1 heterozygotes show increased sensitivity to oxidative stress and decreased pathogenicity. Afr J Microbiol Res. 2012;6:1796–805.
63. Godoy JSR, Kioshima ÉS, Abadio AKR, et al. Structural and functional characterization of the recombinant thioredoxin reductase from *Candida albicans* as a potential target for vaccine and drug design. Appl Microbiol Biotechnol. 2015;100:4015–25.
64. Abadio AKR, Kioshima ES, Teixeira MM, et al. Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. BMC Genom. 2011; 12:75.
65. Hromatka BS, Noble SM, Johnson AD. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the *YHB1* gene in nitrosative stress and virulence. Mol Biol Cell. 2005;16:4814–26.
66. Suenobu N, Kweon M-N, Kiyono H. Nasal vaccination induces the ability to eliminate *Candida* colonization without influencing the pre-existing antigen-specific IgE Abs: a possibility for the control of *Candida*-related atopic dermatitis. Vaccine. 2002;20:2972–80.
67. Haase G, Skopnik H, Kusenbach G. *Exophiala dermatitidis* infection in cystic fibrosis. Lancet. 1990;336:188–9.
68. Nagano Y, Elborn JS, Millar BC, et al. Development of a novel PCR assay for the identification of the black yeast, *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* from adult patients with cystic fibrosis (CF). J Cyst Fibros. 2008;7:576–80.
69. Lebecque P, Leonard A, Huang D, et al. *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* and cystic fibrosis—prevalence and risk factors. Med Mycol. 2010;48(Suppl 1):S4–9.
70. Kondori N, Gilljam M, Lindblad A, Jönsson B, Moore ERB, Wennerås C. High rate of *Exophiala dermatitidis* recovery in the airways of patients with cystic fibrosis is associated with pancreatic insufficiency. J Clin Microbiol. 2011;49:1004–9.
71. Robertson KL, Mostaghim A, Cuomo CA, et al. Adaptation of the black yeast *Wangiella dermatitidis* to ionizing radiation: molecular and cellular mechanisms. PLoS ONE. 2012;7:e48674.
72. Paris S, Wysong D, Debeaupuis JP, et al. Catalases of *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun. 2003;71:3551–62.
73. Calera JA, Paris S, Monod M, et al. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. Infect Immun. 1997;65:4718–24.
74. Leal SM, Vareechon C, Cowden S, et al. Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. J Clin Invest. 2012;122:2482–98.
75. Hillmann F, Bagramyan K, Straßburger M, et al. The crystal structure of peroxiredoxin Asp f3 provides mechanistic insight into oxidative stress resistance and virulence of *Aspergillus fumigatus*. Sci Rep. 2016;6. doi:10.1038/srep33396.
76. Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, et al. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator *AfYap1* represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. Eukaryot Cell. 2007;6: 2290–302.
77. Ito JI, Lyons JM, Hong TB, et al. Vaccinations with recombinant variants of *Aspergillus fumigatus* allergen Asp f 3 protect mice against invasive aspergillosis. Infect Immun. 2006;74:5075–84.
78. Diaz-Arevalo D, Ito JI, Kalkum M. Protective effector cells of the recombinant Asp f3 anti-aspergillosis vaccine. Front Microbiol. 2012;3:299.
79. Ullmann BD, Myers H, Chiranand W, Lazzell AL, Zhao Q, Vega LA, et al. Inducible defense mechanism against nitric oxide in *Candida albicans*. Eukaryot Cell. 2004;3:715–23.
80. Hromatka BS, Noble SM, Johnson AD. Transcriptional response of *Candida albicans* to nitric oxide and the role of the YHB1 gene in nitrosative stress and virulence. Mol Biol Cell. 2005;16:4814–26.
81. Lapp K, Vödisch M, Kroll K, Strassburger M, Kniemeyer O, Heinekamp T, et al. Characterization of the *Aspergillus fumigatus* detoxification systems for reactive nitrogen intermediates and their impact on virulence. Front Microbiol. 2014;5:469.
82. Pérez-Bercoff Å, Papanicolaou A, Ramsperger M, et al. Draft genome of Australian environmental strain WM 09.24 of the opportunistic human pathogen *Scedosporium aurantiacum*. Genome Announc. 2015;3(1):e01526-14.
83. Ghamrawi S, Gastebois A, Zykwinska A, et al. A multifaceted study of *Scedosporium boydii* cell wall changes during germination and identification of GPI-anchored proteins. PLoS ONE. 2015;10:e0128680.
84. Lima OC, Larcher G, Vandeputte P, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a Cu, Zn-superoxide dismutase from Scedosporium apiospermum. Microbes Infect. 2007;9:558–65.
85. Mina S, Marot-Leblond A, Cimon B, et al. Purification and characterization of a mycelial catalase from *Scedosporium boydii*, a useful tool for specific antibody detection in patients with cystic fibrosis. Clin Vaccine Immunol. 2015;22:37–45.
86. Zámocký M, Koller F. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and in vitro mutagenesis. Progr Biophys Mol Biol. 1999;72:19–66.
87. O'Donoghue P, Amaro RE, Luthey-Schulten Z. On the structure of hisH: protein structure prediction in the context of structural and functional genomics. J Struct Biol. 2001;134:257–68.
88. Csuros M, Rogozin IB, Koonin EV. A detailed history of intron-rich eukaryotic ancestors inferred from a global survey of 100 complete genomes. PLoS Comput Biol. 2011;7:e1002150.

Author's personal copy

89. Fuchs BB, RajaMuthiah R, Souza AC, et al. Inhibition of bacterial and fungal pathogens by the orphaned drug auranofin. Future Med Chem. 2016;8:117–32.
90. Erman JE, Vitello LB. Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. Biochim Biophys Acta. 2002;1597:193–220.
91. Zámocký M, Dunand C. Divergent evolutionary lines of fungal cytochrome c peroxidases belonging to the superfamily of bacterial, fungal and plant heme peroxidases. FEBS Lett. 2006;580:6655–64.
92. Dantas AS, Andrade RV, de Carvalho MJ, Felipe MSS, Campos EG. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome c peroxidase. Mycol Res. 2008;112:747–56.
93. van Rantwijk F, Sheldon RA. Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects. Curr Opin Biotechnol. 2000;11:554–64.
94. Park JB, Clark DS. New reaction system for hydrocarbon oxidation by chloroperoxidase. Biotechnol Bioeng. 2006;94:189–92.
95. Johnstone IL, McCabe PC, Greaves P, et al. Isolation and characterisation of the *crnA-niiA-niaD* gene cluster for nitrate assimilation in *Aspergillus nidulans*. Gene. 1990;90: 181–92.
96. Amaar YG, Moore MM. Mapping of the nitrate-assimilation gene cluster (*crnA-niiA-niaD*) and characterization of the nitrite reductase gene (*niiA*) in the opportunistic fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Curr Genet. 1998;33:206–15.
97. Böer E, Schröter A, Bode R, Piontek M, Kunze G. Characterization and expression analysis of a gene cluster for nitrate assimilation from the yeast *Arxula adeninivorans*. Yeast. 2009;26:83–93.
98. Pesce A, Tilleman L, Donné J, et al. Structure and haem-distal site plasticity in *Methanosarcina acetivorans* protoglobin. PLoS ONE. 2013;8(6):e66144.
99. Tranvanky P, Biguet J, Vaucelle T. Study on an antigenic fraction of *Aspergillus fumigatus* supporting a catalase activity. Consequence on the immunologic diagnosis of aspergillosis. Rev Immunol Ther Antimicrob. 1968;32: 37–52.
100. Senet JM, Girault A, Robert R, Girault M. Diagnostic de l'aspergillose par hémagglutination indirecte 2 Utilisation d'une fraction catalasique purifiée d'*Aspergillus fumigatus*. Bull Soc Fr Mycol Méd. 1978;7:229–32.
101. Hamilton AJ, Holdom MD, Hay RJ. Specific recognition of purified Cu, Zn superoxide dismutase from Aspergillus fumigatus by immune human sera. J Clin Microbiol. 1995;33:495–6.
102. Hamilton AJ, Holdom MD, Jeavons L. Expression of the Cu, Zn superoxide dismutase of Aspergillus fumigatus as determined by immunochemistry and immunoelectron microscopy. FEMS Immunol Med Microbiol. 1996;14: 95–102.
103. Sarfati J, Monod M, Recco P, et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006;55:279–91.
104. Holdom MD, Lechenne B, Hay RJ, Hamilton AJ, Monod M. Production and characterization of recombinant Aspergillus fumigatus Cu, Zn superoxide dismutase and its recognition by immune human sera. J Clin Microbiol. 2000;38:558–62.
105. Crameri R, Faith A, Hemmann S, et al. Humoral and cell-mediated autoimmunity in allergy to *Aspergillus fumigatus*. J Exp Med. 1996;184:265–70.
106. Kurup VP, Banerjee B, Hemmann S, Greenberger PA, Blaser K, Crameri R. Selected recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens bind specifically to IgE in ABPA. Clin Exp Allergy. 2000;30:988–93.
107. Mina S, Staerck C, d'Almeida SM, et al. Identification of *Scedosporium boydii* catalase A1 gene, a reactive oxygen species detoxification factor highly expressed in response to oxidative stress and phagocytic cells. Fungal Biol. 2015; 119:1322–33.

4. Etude de la réponse au stress oxydatif chez *S. apiospermum*

Transcriptional profiling of *Scedosporium apiospermum* enzymatic antioxidant gene battery unravels the involvement of thioredoxin reductases in evasion to the oxidative stress

Cindy STAERCK[1], Julie TABIASCO[2], Charlotte GODON[1], Yves Delneste[2,3], Jean-Philippe BOUCHARA[1,4], and Maxime FLEURY[1]

1, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), UNIV Angers, UNIV Brest, Université Bretagne-Loire, Angers, France

2, CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

3, Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, France

4, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

Soumis pour publication.

Résumé

Les espèces du genre *Scedosporium* sont capables de coloniser les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose, et représentent le deuxième groupe de champignons filamenteux dans ce contexte.

Pour survivre et se développer dans les voies respiratoires, les spores inhalées doivent être capables d'échapper au système immunitaire et notamment aux cellules phagocytaires. Ces dernières engendrent un stress oxydatif en libérant des espèces oxygénées (ROS) réactives et azotées (RNS). Ceci est particulièrement vrai au niveau des voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose qui présentent une réaction inflammatoire exacerbée. Pour se protéger et se développer dans cet environnement hostile, les pathogènes ont développé des systèmes enzymatiques antioxydants pour dégrader les ROS (incluant des superoxydes dismutases, catalases, cytochrome C peroxydases, chloroperoxydases, et enzymes des systèmes du glutathion et de la thiorédoxine), et les RNS (comme les flavohémoglobines, nitrate et nitrite réductases). Ici, nous nous sommes intéressés à la réponse aux stress oxydatifs induits par voie chimique ou généré par les cellules phagocytaires, en ciblant les gènes potentiellement impliqués chez *Scedosporium apiospermum.* Parmi les 33 gènes étudiés, 21 sont surexprimés après induction d'un stress par voie chimique, et 13 en co-culture avec des macrophages ou des neutrophiles. Parmis ces gènes, quatre codant les deux thiorédoxine réductases, une peroxyrédoxine, et une catalase sont surexprimés à la fois en réponse à un stress oxydatif chimique, et dans les co-cultures. Ces résultats suggèrent que les thiorédoxine réductases, connues pour leur rôle dans la virulence d'autres champignons, jouent un rôle majeur dans la pathogénicité de *S. apiospermum*, et qu'elles pourraient représenter de nouvelles cibles thérapeutiques

Mots-clés : Antioxydants enzymatiques, Mucoviscidose, *Scedosporium apiospermum,* ROS, RNS, Transcriptomique

Transcriptional profiling of *Scedosporium apiospermum* enzymatic antioxidant gene battery unravels the involvement of thioredoxin reductases in evasion to the oxidative stress

Cindy STAERCK[1], Julie TABIASCO[2], Charlotte GODON[1], Yves Delneste[2,3], Jean-Philippe BOUCHARA[1,4], and Maxime FLEURY[1]

1, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), UNIV Angers, UNIV Brest, Université Bretagne-Loire, Angers, France

2, CRCINA, INSERM, Université de Nantes, Université d'Angers, Angers, France

3, Laboratoire d'Immunologie et Allergologie, Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, France

4, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

JPB and MJJF are members of the ECMM/ISHAM (European Confederation of Medical Mycology / International Society for Human and Animal Mycology) working group *Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis* (*Fri-CF*).

*Correspondance to Maxime J.J. Fleury, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, EA 3142, Institut de Biologie en Santé-IRIS, CHU, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. Phone: +33 (0)2 44 68 83 68; e-mail: maxime.fleury@univ-angers.fr

Running title: Enzymatic response to oxidative stress in *S. apiospermum*

Abstract:

Scedosporium species rank the second, after *Aspergillus fumigatus*, among the filamentous fungi colonizing the airways of patients with cystic fibrosis (CF). Development of microorganisms in the respiratory tract depends on their capacity to evade killing by the host immune system, particularly through the oxidative response of macrophages and neutrophils, with the release of reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS). This is particularly true in the airways of CF patients which display an exacerbated inflammatory reaction. To protect themselves, pathogens have developed various enzymatic antioxidant systems implicated in ROS degradation, including superoxide dismutases, catalases, cytochrome C peroxidases, chloroperoxidases and enzymes of the glutathione and thioredoxin systems, or in RNS degradation, *i.e.* flavohemoglobins, nitrate reductases and nitrite reductases. Here, we investigated the transcriptional regulation of the enzymatic antioxidant gene battery of *Scedosporium apiospermum* in response to oxidative stress induced chemically or by exposure to activated phagocytic cells. Twenty-one out of the 33 genes potentially implicated in the oxidative or nitrosative stress response were overexpressed upon exposure of the fungus to various chemical oxidants, while they were only thirteen in co-cultures with macrophages or neutrophils. Among them, genes encoding two thioredoxin reductases and to a lesser extent, a peroxiredoxin and one catalase were found to be overexpressed after chemical oxidative stress as well as in co-cultures. Taken together, these results suggest that thioredoxin reductases which are known to be virulence factors in other pathogenic fungi, play a key role in pathogenesis of scedosporiosis, and may be new targets for drug development.

Keywords: Enzymatic antioxidant, Cystic Fibrosis, *Scedosporium apiospermum*, ROS, RNS, Transcriptomic response

Introduction

Usually saprophytes living in highly polluted soils and contaminated water, *Scedosporium* species are opportunistic pathogens causing in receptive hosts various diseases ranging from localized infections such as subcutaneous mycetomas to severe and often fatal disseminated infections in immunocompromised individuals (Giraud and Bouchara 2014; Ramirez-Garcia *et al.* 2017). About ten species are recognized today in the *Scedosporium* genus (Ramirez-Garcia *et al.* 2017), but the prominent species remain the closely related *S. boydii* and *S. apiospermum* in Europe (Zouhair *et al.* 2013; Sedlacek *et al.* 2015), and *S. aurantiacum* in Australia (Blyth *et al.* 2010).

With a prevalence ranging from 2 to 17.4%, *Scedosporium* species rank the second, after *A. fumigatus,* among the filamentous fungi colonizing the respiratory tract of patients with cystic fibrosis (CF) (Cimon *et al.* 1995, 2000; Pihet *et al.* 2008; Blyth *et al.* 2010; Borman *et al.* 2010; Paugam *et al.* 2010; Manso *et al.* 2011; Sedlacek *et al.* 2015). These fungi now considered as prominent pathogens in the CF context, are usually responsible for a chronic colonization of the airways (Defontaine *et al*. 2002; Zouhair *et al.* 2013). However, they may also cause true respiratory infections, similar to those due to *A. fumigatus* like bronchitis and allergic broncho-pulmonary mycoses (Cimon *et al.* 2000; Vázquez-Tsuji *et al.* 2006), as well as severe and often fatal disseminated infections following lung transplantation (Castiglioni *et al.* 2002; Husain *et al.* 2005; Symoens *et al.* 2006; Sahi *et al.* 2007; Morio *et al.* 2010).

To colonize the respiratory tract, fungi must adhere to the host tissues and acquire the extracellular iron necessary for numerous essential physiological processes like respiration and ergosterol synthesis, but they also need to cope the host immune response. Macrophages and neutrophils are major effector cells of the innate immune system, releasing various antimicrobial compounds during the inflammatory reaction triggered by the pathogens, including reactive oxygen species (ROS) as superoxide anions and hydrogen peroxide, and reactive nitrogen species (RNS) as nitric oxide (Babior 1984; Fang 2004; Iovine *et al.* 2008; Campbell and Colgan 2015; Staerck *et al.* 2017a). This is particularly true in the CF lung which is characterized by an exacerbated inflammatory reaction (Reid *et al.* 2007; Galli *et al.* 2012).

To prevent macromolecules degradation during oxidative and nitrosative stresses, pathogens have developed a variety of enzymatic antioxidants, including superoxide dismutases (SODs), catalases, cytochrome c peroxidases, chloroperoxidases, enzymes of the glutathione or thioredoxin systems, flavohemoglobins, nitrate and nitrite reductases (Belozerskaya and Gessler 2007; Forrester and Foster 2012; Staerck *et al.* 2017a).

Prior to the sequencing of *S. apiospermum* (Vandeputte *et al.* 2014), few pathogenic factors have been identified in *Scedosporium* species. Studies in this field focused on proteolytic enzymes thought to be involved in the host tissue invasion (Larcher *et al.* 1996; Pereira *et al.* 2009; Silva *et al.* 2011) or in protection of the fungus against the host immune defenses. In *S. boydii,* a cytosolic Cu/Zn-SOD called SODC (Lima *et al.* 2007) and three distinct catalases have been identified, and one of them, *i.e.* catalase A1 (CatA1), was purified and characterized (Mina *et al.* 2015a). Genes encoding SODC and CatA1 were sequenced, and it was demonstrated that *CatA1* gene was highly expressed in response to the oxidative

stress (Mina *et al.* 2015b). Recently a genome-wide analysis in *S. apiospermum* permitted to identify 31 other genes encoding proteins putatively implicated in ROS or RNS detoxification (Staerck *et al.* 2017b). In order to get a better knowledge of the pathogenic mechanisms of *Scedosporium* species, we investigated here the transcriptional response of these genes to chemical oxidative stresses and in co-culture with activated phagocytic cells.

Materials and methods

Fungal strain and growth conditions

Study was conducted on the reference strain *Scedosporium apiospermum* IHEM 14462 originally isolated from a sputum sample from a CF patient and previously used for whole genome sequencing (Vandeputte *et al.* 2014). The fungus was maintained by weekly passages on potatoe-dextrose-agar (PDA, containing in g/L: dextrose, 20; infusion from potatoes, 200; and bacteriological agar, 15; CONDALAB, Madrid, Spain) supplemented with chloramphenicol 0.5%, with incubation at 37°C. Conidia from 9-day-old cultures collected by scraping as previously described (Mina *et al.* 2015b) were inoculated in Yeast extract-Peptone-Dextrose (YPD; containing in g/L: yeast extract, 10; peptone, 20; glucose, 20; and chloramphenicol 0.5%, pH 7) broth in Petri dishes (30 mL per dish; 2 x 10^6 conidia per mL) which were incubated for 24 h at 37°C to obtain hyphae.

For some experiments, the fungus was also cultivated under environmental conditions encountered in the CF airways. In this aim, the fungus was cultivated in YPD broth supplemented with 90 mM NaCl or buffered at pH 5.3 by the addition of 0.5 M 2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid with incubation under normal air conditions, or in YPD broth with incubation under 5% CO_2. After 24 h of incubation, hyphae were recovered by centrifugation (4000 *g*, 15 min) and stored at - 80°C before total RNA extraction. All experiments were performed in triplicate and hyphae grown in YPD broth under normal air conditions were used as control.

Chemical induction of an oxidative or nitrosative stress

For these experiments, 24-h-old hyphae were incubated for 3 h at 37°C in the presence of various chemicals (from Sigma Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) at a concentration ranging from 31.25 µM to 4 mM: (i) menadione (single addition at T0) or hydrogen peroxide (addition at T0 and then every hour) which induce a general stress; (ii) diamide or cumene hydroperoxide (single addition at T0) which generate an oxidative stress triggering specifically the glutathione and thioredoxin systems; and (iii) DETA NO (single addition at T0), which releases NO and thus generates a nitrosative stress. 24 h-old hyphae grown in YPD broth under normal air conditions and incubated for 3 h without any oxidant were used as control. After 3 h of incubation, hyphae were recovered and stored at - 80°C before total RNA extraction.

Co-cultivation with phagocytic cells

Co-culture experiments were realized as previously described (Mina *et al.* 2015b) with slight modifications. The human myelomonocytic leukaemia cell line THP-1 (ATCC) was cultivated in RPMI-1640

medium, and the human promyelocytic cell line HL60 (ATCC) in IMDM. Both culture media were supplemented by the addition of foetal calf serum (10%; PAA Laboratories, Pashing, Austria), L-glutamine (2 mM), sodium pyruvate (1 mM), non-essential amino acids (0.1 mM), HEPES (10 mM) and antibiotics (penicillin 100 U/mL and streptomycin 100 mg/mL, both from Lonza, Verviers, Belgium). Cell cultures were realized in T175 vented flasks at 37°C under 5% CO_2 with a density of 2.10^5-1.10^6 cells/mL, according to the recommendation of ATCC. Phorbol 12-myristate 13-acetate 50 ng/mL (Sigma Aldrich) was added to induce differentiation of THP-1 cells into macrophages (also referred as THP-1 macrophages).
Dimethylsulfoxide (DMSO; Sigma Aldrich) 1.3% was used to induce differentiation of HL60 cells into neutrophils (also referred to as HL60 neutrophils). After differentiation, the cells were washed and incubated overnight in complete medium at a concentration of 1.10^5 cells per cm^2. Before co-cultures, the cells were activated by the addition of 2 mg/mL lipopolysaccharides from *E. coli* O111:B4 (LPS; Sigma Aldrich). Co-cultures were performed at a ratio of one cell for three 24-h-old fungal hyphae in T175 flasks for 1 to 24 h of incubation for LPS-activated TPH-1 macrophages, and 15 to 100 min for LPS-activated HL60 neutrophils. Controls were realized with 24-h-old hyphae in RPMI medium with LPS but without phagocytic cells for each incubation time. The absence of changes in gene expression level in co-cultures with non-activated phagocytic cells was also verified. After co-culture, hyphae were recovered and stored at - 80°C. Biological triplicates were realized for each experiment.

RNA extraction and reverse transcription

For RNA extraction, hyphae were ground in liquid nitrogen, and extraction was performed on 100 mg of the homogenate with Nucleospin RNA plant kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). Genomic DNA was then digested with DNase. Total RNA was quantified by fluorimetry on a qubit fluorimeter 2.0 (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and integrity was verified by 1% agarose gel electrophoresis.

Three micrograms of RNA were then reverse transcribed with the High Capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Waltham, MA) according to the manufacturer's instructions. Reverse transcription was performed on thermal cycler Bioer Genepro, for 5 min at 25°C, followed by 2 h at 37°C and 5 min at 85°C. cDNA were then $1/15^{th}$ diluted in water, and stored at - 20°C before analysis.

Gene expression analysis

The expression of the 33 target genes was analyzed by quantitative real time (RT)-PCR on a Step One Plus thermalcycler (Applied Biosystems Foster City, CA). Quantitative RT-PCR was performed in a 12.5-µL reaction volume containing 1X Fast SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystem), 0.4 µM of each primer **(Supplementary Table 1),** and 20 ng of cDNA. The PCR thermal profile consisted in an initial incubation at 95°C for 20 sec, followed by 40 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 60°C and 15 sec of denaturation at 95°C with a final extension of 1 min at 60°C. Melting curves were obtained at the end of PCR, by increasing temperature from 60°C to 95°C at 0.3°C/sec, to identify possible primer dimerization or off-target amplification. For each gene, quantitative RT-PCR was done in duplicate for each of the three biological replicates. Genes encoding actin and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) were used for

normalization. Relative quantification (RQ) of gene expression was determined from the threshold cycle (Ct) values, according to the following formula (Livak & Schmittgen 2001).

$\Delta Ct_{experiment} = Ct_{target} - Ct_{reference}$, corresponding to experimental conditions

$\Delta Ct_{control} = Ct_{target} - Ct_{reference}$, corresponding to control conditions

$RQ = 2^{-(\Delta Ctexperiment - \Delta Ctcontrol)}$

Statistical analysis

Quantitative RT-PCR data were compared using the Two-Anova test, and results were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Cultivation in CF conditions has little effect on the expression of target genes

Gene expression was evaluated in three CF conditions (90 mM NaCl, acid pH or 5% CO_2). Only a few genes were overexpressed in these conditions. Two genes encoding a thioredoxin and a flavohemoglobin (*SAPIO_CDS8608* and *SAPIO_CDS1359*, respectively) were overexpressed in the presence of 90 mM NaCl, with 3.2- and 3.1-fold changes in expression levels, respectively. Five genes were slightly overexpressed at pH 5.3, encoding respectively a catalase peroxidase, a peroxiredoxin, a thioredoxin, a thioredoxin reductase and a nitrite reductase (*SAPIO_CDS10583, SaPrx2, SAPIO_CDS8608, SAPIO_CDS10274* and *SAPIO_CDS10292*, respectively) with 2.8-, 4.7-, 4.2-, 6.8- and 4.3-fold changes in expression levels, respectively. Likewise, five genes were overexpressed under 5% CO_2, three of them being overexpressed also at pH 5.3 (*SAPIO_CDS10583*, RQ= 3.4; *SAPIO_CDS8608*, RQ= 2.9; *SAPIO_CDS10292*, RQ= 5.5). The last two genes encoding a Cu/Zn-SOD (*SAPIO_CDS7433*) and a Mn-SOD (*SAPIO_CDS3426*) were overexpressed only under 5% CO_2 with a 5.1- and 5.0-fold increase in the expression level, respectively. A single gene was overexpressed in these three conditions, *SAPIO_CDS8608*, encoding thioredoxin **(Supplemental Figure 1).**

Chemical oxidants strongly influence the expression of some enzymatic antioxidant genes

Gene expression was evaluated in hyphae stressed by menadione at concentrations ranging from 0.03125 to 2 mM to induce a global oxidative stress. 13 out of the 33 genes studied were overexpressed **(Figure 1, Table 1)**. *SAPIO_CDS1830* encoding a thioredoxin reductase was the most overexpressed, followed by *SAPIO_CDS0416, SAPIO_CDS6039, SAPIO_CDS4327,* and *SAPIO_CDS8864* encoding a glutaredoxin, a glutathione reductase, a Cu/Zn-SOD, and a glutathione peroxidase, respectively. Although the maximum expression level was reached for low concentrations of menadione (0.25 or 0.5 mM) for some genes, in most cases the gene expression levels progressively increased with the concentration of menadione up to the highest concentration tested.

Exposure to hydrogen peroxide, that also induces a global oxidative stress, resulted in the overexpression of 12 out of the 33 target genes **(Table 1, Supplemental Figure 2)**. Eight of these genes

were also overexpressed in response to menadione, including the abovementioned genes. *SAPIO_CDS4931* encoding a glutathione reductase was the most overexpressed, followed two other genes encoding proteins of the glutathione system (*SAPIO_CDS6039* and *SAPIO_CDS0416*) and four of the genes encoding proteins of the thioredoxin system (*SAPIO_CDS9937*, *SAPIO_CDS10274*, *SaPrx2* and *SAPIO_CDS1830*).

Diamide and cumene hydroperoxide which specifically target proteins of the glutathione and thioredoxin systems, induced the overexpression of 5 out of the 10 genes of the glutathione system and 3 of the 6 genes of the thioredoxin system for diamide **(Figure 2A, Table 1)**, and of 3 and 4 genes of the glutathione and thioredoxin systems for cumene hydroperoxide **(Figure 2B, Table 1)**. The highest fold changes were obtained for *SAPIO_CDS10274* with diamide and *SAPIO_CDS6039* with hydroperoxide cumene.

Finally, the use of DETA NO, that leads specifically to a nitrosative stress, induced the overexpression of two of the target genes, a flavohemoglobin (*SAPIO_CDS8682*) and a nitrite reductase (*SAPIO_CDS10292*) **(Figure 3, Table 1)**.

Genes of the thioredoxin system are strongly induced by co-cultivation with phagocytic cells

To better understand the potential role of enzymatical antioxidant gene battery in an innate immune context, the gene expression profile was also analyzed in 24-h-old hyphae co-cultivated with LPS-activated TPH-1 macrophages or HL60 neutrophils. No changes were seen in the gene expression levels after co-culture with non-activated THP-1 macrophages or HL60 neutrophils performed as control.

Only four genes showed an overexpression in co-culture with activated TPH-1 macrophages. After three hours of co-culture, a maximum expression level was observed for *SAPIO_CDS1830* gene, encoding one of the thioredoxin reductases, (3.6-fold change compared to the control). The 3 others genes, *SAPIO_CDS10274* (encoding another thioredoxin reductase), *SaPrx2* (encoding a peroxiredoxin) and *SAPIO_CDS4185* (encoding one of the catalases) displayed a maximum level expression at 12 h of co-culture, with a 14.6-, 13.0- and 9.4-fold increase, respectively **(Figure 4, Table 1).** Expression of the other target genes remained unchanged.

Shorter times of incubation were used with LPS-activated HL60 neutrophils due to the quick release of ROS after their activation. In co-culture with these cells, 13 genes were overexpressed **(Supplemental Figure 3, Table 1)**. For most of them (11), the maximum expression level was reached very quickly, after 30 min of co-culture whereas a 60- or 75-min of incubation was needed for the two other genes, *i.e. SAPIO_CDS8682* and *SAPIO_CDS1359* genes which encode flavohemoglobins. The highest relative expression levels were obtained for two genes of the thioredoxin system, i.e. *SAPIO_CDS10274* and *SaPrx2*, which encode a thioredoxin reductase and a peroxiredoxin (11- and 10-fold changes, respectively), followed by a *SAPIO_CDS4185* and *SAPIO_CDS4327* which encode a catalase and a Cu/Zn-SOD (8.4- and 8.3-fold changes, respectively) **(Supplemental Figure 3, Table 1)**.

To sum-up, in co-culture with both phagocytic cell lines, the highest relative expression levels were seen for *SAPIO_CDS10274*, *SaPrx2*, and *SAPIO_CDS4185*.

Discussion

Few data are available today regarding the pathogenesis of *Scedosporium* infections. To establish an infection, pathogens must evade the host immune defenses. One prominent mechanism in the host defense against pathogens is the oxidative burst response of phagocytic cells and the subsequent release of ROS and RNS. The role of ROS in the host defense against pathogens is particularly well illustrated by the occurrence of infections in patients with chronic granulomatous disease (CGD). Indeed, mutations of *Nox* gene encoding the NADPH oxidase, which characterize this genetic disease, result in a defective production of superoxide anions by phagocytic cells, correlated with an increased susceptibility to respiratory pathogens (Roos 2016). Interestingly, most of the pathogens causing respiratory infections in CGD patients are also common CF pathogens, including *Staphylococcus aureus* and *Burkholderia cepacia* for bacteria, and *A. fumigatus, Scedosporium* and *Lomentospora* species, the *Rasamsonia argillacea* species complex or *E. dermatitidis* for filamentous fungi (Kenney *et al.* 1992; Santos *et al.* 2000; Bhat *et al.* 2007; Giraud *et al.* 2010; Giraud and Bouchara 2014; Roos 2016)**.**

Evasion of pathogens to the oxidative or nitrosative stress is essential to survive in the environment and to cause an infection. Regarding *S. apiospermum*, recent analysis of the genome revealed a set of 33 genes encoding SODs (7), catalases (4), proteins of the glutathione system (10) and of the thioredoxin system (6), chloroperoxidase (1), cytochrome c peroxidase (1), flavohemoglobins (2), nitrate reductase (1) and nitrite reductase (1), which are potentially implicated in protection of the fungus against the oxidative or nitrosative stress (Staerck *et al.* 2017b). Here we showed overexpression of 21 of these genes in response to an oxidative or nitrosative stress induced chemically or by co-cultivation of the fungus with phagocytic cells, suggesting for these genes a role in the protection of the fungus against the host immune defenses.

Twelve of these genes were not significantly overexpressed in none of our experimental conditions, including genes encoding two Cu/Zn-SODs. Nevertheless, one cannot disregard the involvement of these genes in protection of the fungus against the host defenses. First, they may be constitutively expressed as the Cu/Zn-SOD of *Candida glabrata* (Briones-Martin-Del-Campo *et al.* 2014). The functional redundancy in the same protein family, as well as between some protein families also should be considered. For instance, expression of one of the four catalases identified in *S. apiospermum* was unchanged. This catalase (encoded by *SAPIO_CDS4198*) is a bifunctional catalase also degrading peroxide as glutathione peroxidases and peroxiredoxins, and several genes encoding these last enzymes were found to be overexpressed. Likewise, for each protein family, at least one of the encoding genes was found to be overexpressed, perhaps compensating the lack of response of the others. Finally, study was conducted on 24-h-old hyphae and one may speculate the expression of some genes specifically in other morphological stages of the fungus. For example, expression of *SAPIO_CDS3212* encoding a Cu/Zn-SOD was unchanged in all our experimental conditions. However, we showed previously that this enzyme is a glycosyl phosphatidyl inositol-anchored cell wall protein expressed exclusively at the surface of the conidia which are the infecting form of the fungus (Ghamrawi *et al.* 2015). Likewise, four SOD genes were identified in

A. fumigatus genome, two of them were highly expressed in conidia while *AfSOD3* was expressed only in hyphae (Lambou *et al.* 2010).

21 genes were significantly overexpressed in at least one of our experimental conditions, and 12 upon exposure to both a chemically induced oxidative stress and an oxidative stress induced either by THP-1 or HL60 cells. Interestingly, while some genes encoding proteins of the glutathione system were highly overexpressed in response to a chemically induced oxidative stress (the two genes encoding glutathione peroxidases, one of the five genes encoding a glutaredoxin, and two of the three genes encoding glutathione reductases), only one of them (*SAPIO_CDS4931* encoding a glutathione reductase) was found to be overexpressed in co-culture with LPS-activated HL60 neutrophils. In *C. albicans*, the glutathione reductase GLR1 is also induced upon exposure to hydrogen peroxide (Alarco and Raymond 1999) as well as in co-culture with human neutrophils (Fradin *et al.* 2005), and was shown to be involved in virulence of the yeast in the *Galleria mellonella* model (Tillmann *et al.* 2015). Likewise this enzyme is essential to virulence of *C. neoformans* in mice (Missall *et al.* 2006). Further studies are needed to define the role of this glutathione reductase in the pathogenesis of scedosporiosis. As for the other genes of the glutathione system, their lack of response upon exposure to phagocytic cells suggests a prominent role for other antioxidant genes, such as components of the thioredoxin system.

Only two genes encoding a thioredoxin reductase (*SAPIO_CDS1830*) and a peroxiredoxin (*SaPrx2*) were overexpressed upon exposure to both menadione and hydrogen peroxide as well as in co-culture with THP1 and HL60 cells, whereas two other genes were up-regulated in these co-cultures as well as upon exposure to either menadione or hydrogen peroxide, *i.e. SAPIO_CDS4185* and *SAPIO_CDS10274* which encodes one catalase and the other thioredoxin reductase **(Supplemental Figure S4)**. These genes were also highly expressed in response to diamide and cumene hydroperoxide, particularly the thioredoxin reductase gene *SAPIO_CDS10274* which showed the highest changes in expression level.

Catalases are known to detoxify hydrogen peroxide and to participate to evasion of the pathogen to the oxidative stress. Nevertheless, in most cases, they did not seem to be essential for virulence. For example, three catalases are described in *A. fumigatus*, including the spore-specific CatA and two mycelial catalases, the monofunctional catalase Cat1 and the catalase-peroxidase Cat2, but the delta CatA mutant was as virulent as the wild-type strain in a rat model of aspergillosis and the double mutant delta cat1 delta cat2 exhibited only delayed infection in this experimental model (Paris *et al.* 2003). Likewise, four catalase genes have been described in *C. neoformans*, and no differences were seen in virulence in a mouse model between a wild-type strain and single or even quadruple mutants (Giles *et al.* 2006). Conversely, a single catalase gene *CAT1* was identified in *C. albicans*, and a markedly decreased virulence was reported for the homozygous null mutant in a mouse model of disseminated candidiasis (Wysong *et al.* 1998).

The role of fungal peroxiredoxins in virulence is poorly documented. In *A. fumigatus*, the Asp f3 allergen was identified as a member of the peroxiredoxin protein family, and disruption of the encoding gene resulted in an hypersensitivity to external superoxide and in a total lack of virulence in mice, suggesting that these enzymes could be therapeutic targets (Hillmann *et al.* 2016).

Our results also suggest that genes encoding the two thioredoxin reductases in *S. apiospermum* could play an important role in protecting the fungal cells against ROS and RNS. There is now an increasing body of evidence that these enzymes display a high potential for drug design and vaccine development (Abadio *et al.* 2011; Ianiri and Idnurm 2015). For example, the *C. albicans* thioredoxin reductase (*Ca*TrxR or TRR1) is highly overexpressed under oxidative stress and is implicated in ROS and RNS degradation, especially in response to neutrophils (Enjalbert *et al.* 2003; Fradin *et al.* 2005; Kusch *et al.* 2007), as well as in virulence in a mouse model of candidiasis (Zaki *et al.* 2012). Likewise, recombinant *Ca*TrxR protein induced high levels of serum specific antibodies and reduced the fungal burden in experimental disseminated candidiasis in mice (Godoy *et al.* 2015). In addition, recent studies on the thioredoxin reductase inhibitor auranofin (Roder and Thomson 2015) highlighted its promising antimicrobial potential against various bacteria (Harbut *et al.* 2015; Fuchs *et al.* 2016; Thangamani *et al.* 2016b,a), as well as some pathogenic yeasts (Fuchs *et al.* 2016; Wiederhold *et al.* 2016) and filamentous fungi (Wiederhold *et al.* 2016).

Finally, our experiments also showed overexpression of the flavohemoglobin gene *SAPIO_CDS8682* and the nitrite reductase gene *SAPIO_CDS10292* upon exposure to DETA-NO. Although further investigations on these genes are needed, recent studies performed on *A. fumigatus* which revealed a prominent role of the flavohemoglobin FhpA in protection of the conidia against RNS, also showed no differences in killing of the conidia by macrophages and in virulence for mice between the wild-type strain and the *FhpA* mutant (Lapp *et al.* 2014).

In conclusion, this study provides new insights into the response of *S. apiospermum* to the oxidative or nitrosative stress. As observed in other human pathogenic fungi, several genes were deregulated in *S. apiospermum* hyphae upon exposure to ROS and RNS, suggesting a role in protecting the fungus. Further studies are needed to confirm their involvement in protection of the fungus against the host immune defenses. Considering literature data, a particular attention should be paid to genes encoding some proteins of the thioredoxin system, particularly *SaPrx2* and the thioredoxin reductase genes. These genes which play an essential role in virulence in other fungal pathogens, were overexpressed in most of our experimental conditions, and therefore could be considered as potential targets for drug development.

Acknowledgments

The financial support of *Vaincre la Mucoviscidose* for Cindy Staerck's PhD thesis is gratefully acknowledged (RF20140501104).

References

Abadio, A.K.R., Kioshima, E.S., Teixeira, M.M., Martins, N.F., Maigret, B., and Felipe, M.S.S. (2011) Comparative genomics allowed the identification of drug targets against human fungal pathogens. *BMC Genomics* **12**: 75.

Alarco, A.M., and Raymond, M. (1999) The bZip transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *J Bacteriol* **181**: 700–708.

Babior, B.M. (1984) The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* **73**: 599–601.

Belozerskaya, T.A., and Gessler, N.N. (2007) Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. *Appl Biochem Microbiol* **43**: 506–515.

Bhat, S.V., Paterson, D.L., Rinaldi, M.G., and Veldkamp, P.J. (2007) *Scedosporium prolificans* brain abscess in a patient with chronic granulomatous disease: successful combination therapy with voriconazole and terbinafine. *Scand J Infect Dis* **39**: 87–90.

Blyth, C., Harun, A., Middleton, P.G., Sleiman, S., Lee, O., Sorrell, T.C., *et al*. (2010) Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. *J Clin Microbiol* **48**: 314–316.

Borghi, E., Iatta, R., Manca, A., Montagna, M.T., and Morace, G. (2010) Chronic airway colonization by *Scedosporium apiospermum* with a fatal outcome in a patient with cystic fibrosis. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S108-113.

Borman, A.M., Palmer, M.D., Delhaes, L., Carrère, J., Favennec, L., Ranque, S., *et al.* (2010) Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S88-97.

Briones-Martin-Del-Campo, M., Orta-Zavalza, E., Juarez-Cepeda, J., Gutierrez-Escobedo, G., Cañas-Villamar, I., Castaño, I., and De Las Peñas, A. (2014) The oxidative stress response of the opportunistic fungal pathogen *Candida glabrata*. *Rev Iberoam Micol* **31**: 67–71.

Campbell, E.L., and Colgan, S.P. (2015) Neutrophils and inflammatory metabolism in antimicrobial functions of the mucosa. *J Leukoc Biol* **98**: 517–522.

Castiglioni, B., Sutton, D.A., Rinaldi, M.G., Fung, J., and Kusne, S. (2002) *Pseudallescheria boydii* (Anamorph *Scedosporium apiospermum*). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. *Medicine* **81**: 333–348.

Cimon, B., Carrère, J., Chazalette, J., Giniès, J., Six, P., Vinatier, J.F., *et al.* (1995) Fungal colonization and immune response to fungi in cystic fibrosis. *J Mycol Méd* **5**: 211–216.

Cimon, B., Carrère, J., Vinatier, J.F., Chazalette, J.P., Chabasse, D., and Bouchara, J.P. (2000) Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **9**: 53–56.

Defontaine, A., Zouhair, R., Cimon, B., Carrère, J., Bailly, E., Symoens, F., *et al.* (2002) Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **40**: 2108–2114.

Enjalbert, B., Nantel, A., and Whiteway, M. (2003) Stress-induced gene expression in *Candida albicans*: absence of a general stress response. *Mol Biol Cell* **14**: 1460–1467.

Fang, F.C. (2004) Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nat Rev Microbiol* **2**: 820–832.

Forrester, M.T., and Foster, M.W. (2012) Protection from nitrosative stress: a central role for microbial flavohemoglobin. *Free Radic Biol Med* **52**: 1620–1633.

Fradin, C., De Groot, P., MacCallum, D., Schaller, M., Klis, F., Odds, F.C., and Hube, B. (2005) Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Mol Microbiol* **56**: 397–415.

Fuchs, B.B., RajaMuthiah, R., Souza, A.C.R., Eatemadpour, S., Rossoni, R.D., Santos, D.A., *et al.* (2016) Inhibition of bacterial and fungal pathogens by the orphaned drug auranofin. *Future Med Chem* **8**: 117–132.

Galli, F., Battistoni, A., Gambari, R., Pompella, A., Bragonzi, A., Pilolli, F., *et al.* (2012) Oxidative stress and antioxidant therapy in cystic fibrosis. *Biochim Biophys Acta* **1822**: 690–713.

Ghamrawi, S., Gastebois, A., Zykwinska, A., Vandeputte, P., Marot, A., Mabilleau, G., *et al.* (2015) A multifaceted study of *Scedosporium boydii* cell wall changes during germination and identification of GPI-anchored proteins. *PLoS One* **10**: e0128680.

Giles, S.S., Stajich, J.E., Nichols, C., Gerrald, Q.D., Alspaugh, J.A., Dietrich, F., and Perfect, J.R. (2006) The *Cryptococcus neoformans* catalase gene family and its role in antioxidant defense. *Eukaryot Cell* **5**: 1447–1459.

Giraud, S., and Bouchara, J.P. (2014) *Scedosporium apiospermum* complex: diagnosis and species identification. *Curr Fungal Infect Rep* **8**: 211–219.

Giraud, S., Pihet, M., Razafimandimby, B., Carrère, J., Degand, N., Mely, L., *et al.* (2010) *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **48**: 2381–2386.

Godoy, J.S.R., Kioshima, É.S., Abadio, A.K.R., Felipe, M.S.S., de Freitas, S.M., and Svidzinski, T.I.E. (2015) Structural and functional characterization of the recombinant thioredoxin reductase from *Candida albicans* as a potential target for vaccine and drug design. *Appl Microbiol Biotechnol* **100**: 4015–4025.

Harbut, M.B., Vilchèze, C., Luo, X., Hensler, M.E., Guo, H., Yang, B., *et al.* (2015) Auranofin exerts broad-spectrum bactericidal activities by targeting thiol-redox homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: 4453–4458.

Hillmann, F., Bagramyan, K., Straßburger, M., Heinekamp, T., Hong, T.B., Bzymek, K.P., *et al.* (2016) The crystal structure of peroxiredoxin Asp f3 provides mechanistic insight into oxidative stress resistance and virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Sci Rep* **6**:33396.

Husain, S., Muñoz, P., Forrest, G., Alexander, B.D., Somani, J., Brennan, K., *et al.* (2005) Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* in transplant recipients: clinical characteristics and impact of antifungal agent therapy on outcome. *Clin Infect Dis* **40**: 89–99.

Ianiri, G., and Idnurm, A. (2015) Essential gene discovery in the basidiomycete *Cryptococcus neoformans* for antifungal drug target prioritization. *mBio* **6**: e02334-14.

Iovine, N.M., Pursnani, S., Voldman, A., Wasserman, G., Blaser, M.J., and Weinrauch, Y. (2008) Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun* **76**: 986–993.

Kenney, R.T., Kwon-Chung, K.J., Waytes, A.T., Melnick, D.A., Pass, H.I., Merino, M.J., and Gallin, J.I. (1992) Successful treatment of systemic *Exophiala dermatitidis* infection in a patient with chronic granulomatous disease. *Clin Infect Dis* **14**: 235–242.

Kusch, H., Engelmann, S., Albrecht, D., Morschhäuser, J., and Hecker, M. (2007) Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Proteomics* **7**: 686–697.

Lambou, K., Lamarre, C., Beau, R., Dufour, N., and Latgé, J.P. (2010) Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Mol Microbiol* **75**: 910–923.

Lapp, K., Vödisch, M., Kroll, K., Strassburger, M., Kniemeyer, O., Heinekamp, T., and Brakhage, A.A. (2014) Characterization of the *Aspergillus fumigatus* detoxification systems for reactive nitrogen intermediates and their impact on virulence. *Front Microbiol* **5**:469.

Larcher, G., Cimon, B., Symoens, F., Tronchin, G., Chabasse, D., and Bouchara, J.P. (1996) A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochem J* **315 (Pt 1)**: 119–126.

Lima, O.C., Larcher, G., Vandeputte, P., Lebouil, A., Chabasse, D., Simoneau, P., and Bouchara, J.P. (2007) Molecular cloning and biochemical characterization of a Cu,Zn-superoxide dismutase from *Scedosporium apiospermum*. *Microbes Infect* **9**: 558–565.

Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2−ΔΔCT method. *Methods* **25**: 402–408.

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

Mina, S., Marot-Leblond, A., Cimon, B., Fleury, M.J.J., Larcher, G., Bouchara, J.P., and Robert, R. (2015a) Purification and characterization of a mycelial catalase from *Scedosporium boydii*, a useful tool for specific antibody detection in patients with cystic fibrosis. *Clin Vaccine Immunol* **22**: 37–45.

Mina, S., Staerck, C., d'Almeida, S.M., Marot, A., Delneste, Y., Calenda, A., *et al.* (2015b) Identification of *Scedosporium boydii* catalase A1 gene, a reactive oxygen species detoxification factor highly expressed in response to oxidative stress and phagocytic cells. *Fungal Biol* **119**: 1322–1333.

Missall, T.A., and Lodge, J.K. (2005) Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryot Cell* **4**: 487–489.

Missall, T.A., Pusateri, M.E., Donlin, M.J., Chambers, K.T., Corbett, J.A., and Lodge, J.K. (2006) Posttranslational, translational, and transcriptional responses to nitric oxide stress in *Cryptococcus neoformans*: implications for virulence. *Eukaryot Cell* **5**: 518–529.

Morio, F., Horeau-Langlard, D., Gay-Andrieu, F., Talarmin, J.P., Haloun, A., Treilhaud, M., *et al.* (2010) Disseminated *Scedosporium/Pseudallescheri*a infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis. *J Clin Microbiol* **48**: 1978–1982.

Paris, S., Wysong, D., Debeaupuis, J.P., Shibuya, K., Philippe, B., Diamond, R.D., and Latgé, J.P. (2003) Catalases of *Aspergillus fumigatus*. *Infect Immun* **71**: 3551–3562.

Paugam, A., Baixench, M.T., Demazes-Dufeu, N., Burgel, P.R., Sauter, E., Kanaan, R., *et al.* (2010) Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. *Med Mycol* **48 Suppl 1**: S32-36.

Pereira, M.M., Silva, B.A., Pinto, M.R., Barreto-Bergter, E., and dos Santos, A.L.S. (2009) Proteins and peptidases from conidia and mycelia of *Scedosporium apiospermum* strain HLPB. *Mycopathologia* **167**: 25–30.

Pihet, M., Carrère, J., Cimon, B., Chabasse, D., Delhaes, L., Symoens, F., and Bouchara, J.P. (2008) Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis – a review. *Med Mycol* **47**: 387–397.

Ramirez-Garcia, A., Pellon, A., Rementeria, A., Buldain, I., Barreto-Bergter, E., Rollin-Pinheiro, R., *et al.* (2017) *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists. *Med Mycol*

Reid, D.W., Misso, N., Aggarwal, S., Thompson, P.J., and Walters, E.H. (2007) Oxidative stress and lipid-derived inflammatory mediators during acute exacerbations of cystic fibrosis. *Respirology* **12**: 63–69.

Roder, C., and Thomson, M.J. (2015) Auranofin: repurposing an old drug for a golden new age. *Drugs R D* **15**: 13–20.

Roos, D. (2016) Chronic granulomatous disease. *Br Med Bull* **118**: 50–63.

Sahi, H., Avery, R.K., Minai, O.A., Hall, G., Mehta, A.C., Raina, P., and Budev, M. (2007) *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) infection in lung transplant recipients. *J Heart Lung Transplant* **26**: 350–356.

Santos, P.E., Oleastro, M., Galicchio, M., and Zelazko, M. (2000) Fungal infections in paediatric patients with chronic granulomatous disease. *Rev Iberoam Micol* **17**: 6–9.

Sedlacek, L., Graf, B., Schwarz, C., Albert, F., Peter, S., Würstl, B., *et al.* (2015) Prevalence of *Scedosporium species* and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. *J Cyst Fibros* **14**: 237–41.

Silva, B.A., Souza-Gonçalves, A.L., Pinto, M.R., Barreto-Bergter, E., and Santos, A.L.S. (2011) Metallopeptidase inhibitors arrest vital biological processes in the fungal pathogen *Scedosporium apiospermum*. *Mycoses* **54**: 105–112.

Staerck, C., Gastebois, A., Vandeputte, P., Calenda, A., Larcher, G., Gillmann, L., *et al.* (2017a) Microbial antioxidant defense enzymes. *Microb Pathog* **110**: 56–65.

Staerck, C., Vandeputte, P., Gastebois, A., Calenda, A., Giraud, S., Papon, N., *et al.* (2017b) Enzymatic mechanisms involved in evasion of fungi to the oxidative stress: Focus on *Scedosporium apiospermum*. *Mycopathologia* : 1–13.

Sugui, J.A., Kim, H.S., Zarember, K.A., Chang, Y.C., Gallin, J.I., Nierman, W.C., and Kwon-Chung, K.J. (2008) Genes differentially expressed in conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon exposure to human neutrophils. *PloS One* **3 (7)**: e2655.

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

Thangamani, S., Mohammad, H., Abushahba, M.F.N., Sobreira, T.J.P., Hedrick, V.E., Paul, L.N., and Seleem, M.N. (2016a) Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens. *Sci Rep* **6**: 22571.

Thangamani, S., Mohammad, H., Abushahba, M.F.N., Sobreira, T.J.P., and Seleem, M.N. (2016b) Repurposing auranofin for the treatment of cutaneous staphylococcal infections. *Int J Antimicrob Agents* **47**: 195–201.

Tillmann, A.T., Strijbis, K., Cameron, G., Radmaneshfar, E., Thiel, M., Munro, C.A., *et al.* (2015) Contribution of Fdh3 and Glr1 to glutathione redox state, stress adaptation and virulence in *Candida albicans*. *PloS One* **10 (6)**: e0126940.

Vandeputte, P., Ghamrawi, S., Rechenmann, M., Iltis, A., Giraud, S., Fleury, M., *et al*. (2014) Draft genome sequence of the pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. *Genome Announc* **2 (5)**. pii: e00988-14.

Vázquez-Tsuji, O., Campos Rivera, T., Rondán Zárate, A., and Mirabal García, M. (2006) Endobronchitis by *Scedosporium apiospermum* in a child with cystic fibrosis. *Rev Iberoam Micol* **23**: 245–248.

Wiederhold, N.P., Patterson, T.F., Srinivasan, A., Chaturvedi, A.K., Fothergill, A.W., Wormley, F.L., *et al.* (2016) Repurposing auranofin as an antifungal: *In vitro* activity against a variety of medically important fungi. *Virulence* **8**: 138-142.

Wysong, D.R., Christin, L., Sugar, A.M., Robbins, P.W., and Diamond, R.D. (1998) Cloning and sequencing of a *Candida albicans* catalase gene and effects of disruption of this gene. *Infect Immun* **66**: 1953–1961.

Zaki, N., Bakar, F., Mahadi, N., and Murad, A. (2012) *Candida albicans* TRR1 heterozygotes show increased sensitivity to oxidative stress and decreased pathogenicity. *Afr J Microbiol Res* **6**: 1796–1805.

Zouhair, R., Rougeron, A., Razafimandimby, B., Kobi, A., Bouchara, J.P., and Giraud S. (2013) Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Med Mycol* **51**: 603–613.

TABLE 1: Gene expression levels in 24-h-old *S. apiospermum* hyphae exposed to a chemical oxidative stress or co-cultivated with LPS-activated phagocytes.

Gene annotation and accession number	Exposure to					Co-culture with LPS-activated	
	Menadione	H_2O_2	Diamide	Cumene	DETA NO	THP-1 macrophages	HL60 neutrophils
Cu/Zn-SODs							
CDS2117	**17.4 (2)**	5.3 (2)	/	/	/	2.2 (3 h)	2.7 (30 min)
CDS3212	2.8 (2)	4.2 (1)	/	/	/	1.5 (12 h)	1.9 (30 min)
CDS4327	**19.7 (1)**	**10.5 (2)**	/	/	/	3.5 (12 h)	**8.3 (30 min)**
CDS7433	9.1 (0.25)	5.1 (2)	/	/	/	1.3 (7 h)	1.4 (30 min)
Mn-SODs							
CDS3426	2.4 (2)	1.1 (2)	/	/	/	1.7 (3 h)	1.9 (30 min)
CDS6474	**15.6 (0.25)**	**8.6 (2)**	/	/	/	2.0 (7 h)	**4.4 (30 min)**
CDS8679	4.2 (2)	3.8 (0.25)	/	/	/	1.8 (3 h)	2.2 (30 min)
Catalases							
CDS2912	6.0 (2)	**9.4 (2)**	/	/	/	2.0 (24 h)	2.2 (30 min)
CDS4185	**11 (2)**	5.6 (2)	/	/	/	**9.4 (12 h)**	**8.4 (30 min)**
Catalases-peroxidases							
CDS4198	4.6 (2)	2.7 (1)	/	/	/	1.2 (7 h)	2.6 (30 min)
CDS10583	**11.9 (2)**	3.5 (2)	/	/	/	2.4 (3 h)	**3.8 (30 min)**
Glutathione peroxidases							
CDS4353	6.0 (0.5)	6.5 (2)	**7.5 (2)**	14.1 (4)	/	1.4 (12 h)	1.6 (60 min)
CDS8864	**17.8 (0.25)**	**9.6 (2)**	4.9 (1)	**72.1 (2)**	/	1.5 (12 h)	1.5 (30 min)
Glutaredoxins							
CDS0416	**31.1 (0.5)**	**28.6 (0.25)**	**15.3 (1)**	10.2 (1)	/	1.2 (12 h)	1.9 (30 min)
CDS3187	3.6 (2)	1.8 (2)	2.6 (1)	5.2 (1)	/	1.8 (3 h)	1.7 (30 min)
CDS3482	2.8 (2)	1.7 (0.25)	4.0 (4)	6.4 (2)	/	2.2 (1 h)	2.5 (30 min)
CDS8578	3.6 (0.5)	2.8 (2)	6.2 (4)	27.0 (4)	/	1.9 (3 h)	2.6 (30 min)
CDS3162	3.3 (2)	4.7 (0.25)	**7.3 (1)**	6.2 (1)	/	2.0 (1 h)	1.4 (30 min)

TABLE 1 (continued).

Gene annotation and accession number	Exposure to					Co-culture with LPS-activated	
	Menadione	H_2O_2	Diamide	Cumene	DETA NO	THP-1 macrophages	HL60 neutrophils
Glutathione reductases							
CDS4534	1.8 (1)	6.4 (0.25)	4.4 (1)	2.4 (2)	/	1.7 (1 h)	1.6 (60 min)
CDS4931	9.4 (0.5)	**79.4 (0.5)**	**22.8 (1)**	**26.5 (2)**	/	2.1 (12 h)	**7.7 (30 min)**
CDS6039	**21.6 (0.5)**	**34 (2)**	**13.0 (1)**	**85.0 (2)**	/	1.9 (24 h)	2.0 (30 min)
Peroxiredoxins							
CDS4142	4.9 (2)	5.9 (2)	3.2 (2)	12.0 (2)	/	1.7 (12 h)	1.7 (60 min)
CDS9937	**11.3 (0.5)**	**28.7 (2)**	**13.8 (1)**	**33.6 (2)**	/	1.3 (12 h)	1.2 (75 min)
SaPrx2	**14.0 (0.5)**	**20 (0.5)**	**22.9 (1)**	**25.6 (2)**	/	**13.0 (12 h)**	**10.0 (30 min)**
Thioredoxin							
CDS8608	6.7 (0.5)	4.5 (2)	7.7 (1)	10.1 (4)	/	2.1 (3 h)	2.7 (30 min)
Thioredoxin reductases							
CDS1830	**68.5 (2)**	**14.9 (0.25)**	4.1 (4)	**66.3 (4)**	/	**3.6 (3 h)**	**3.9 (30 min)**
CDS10274	8.1 (1)	**20.7 (0.5)**	**77.2 (1)**	**40.0 (2)**	/	**14.6 (12 h)**	**11 (30 min)**
Cytochrome C peroxidase							
CDS3675	2.1 (2)	1.3 (0.125)	/	/	/	1.6 (3 h)	1.9 (30 min)
Chloride peroxidase							
CDS8967	**10.7 (2)**	5.2 (2)	/	/	/	2.8 (12 h)	**5.4 (30 min)**
Flavohemoglobins							
CDS1359	1.8 (2)	**14.1 (0.25)**	/	/	6.1 (4)	2.6 (3 h)	**3.7 (75 min)**
CDS8682	1.9 (0.03125)	1.4 (0.25)	/	/	**18.4 (4)**	2.5 (12 h)	**3.5 (60 min)**
Nitrate reductase							
CDS10293	8.4 (2)	1.7 (0.25)	/	/	6.2 (4)	2.7 (3 h)	**4.5 (30 min)**
Nitrite reductase							
CDS10292	**13.1 (2)**	6.8 (2)	/	/	**54.4 (2)**	2.6 (24 h)	**7.4 (30 min)**

Coding sequences (CDS) are indicated in Genbank database with the prefix *SAPIO_* for genome of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 (Vandeputte *et al.* 2014) except for SaPrx2, which was not considered as a coding sequence in the draft genome sequence of *S. apiospermum,* and was identified by a blastn analysis of the whole genome. Data correspond to the maximum expression levels (expressed in fold changes) for each gene and in parenthesis is indicated the concentration (in mM) of the chemical oxidant or the duration of co-culture needed to reach this value. Significant increases in the gene expression levels are highlighted in bold font. /: not determined.

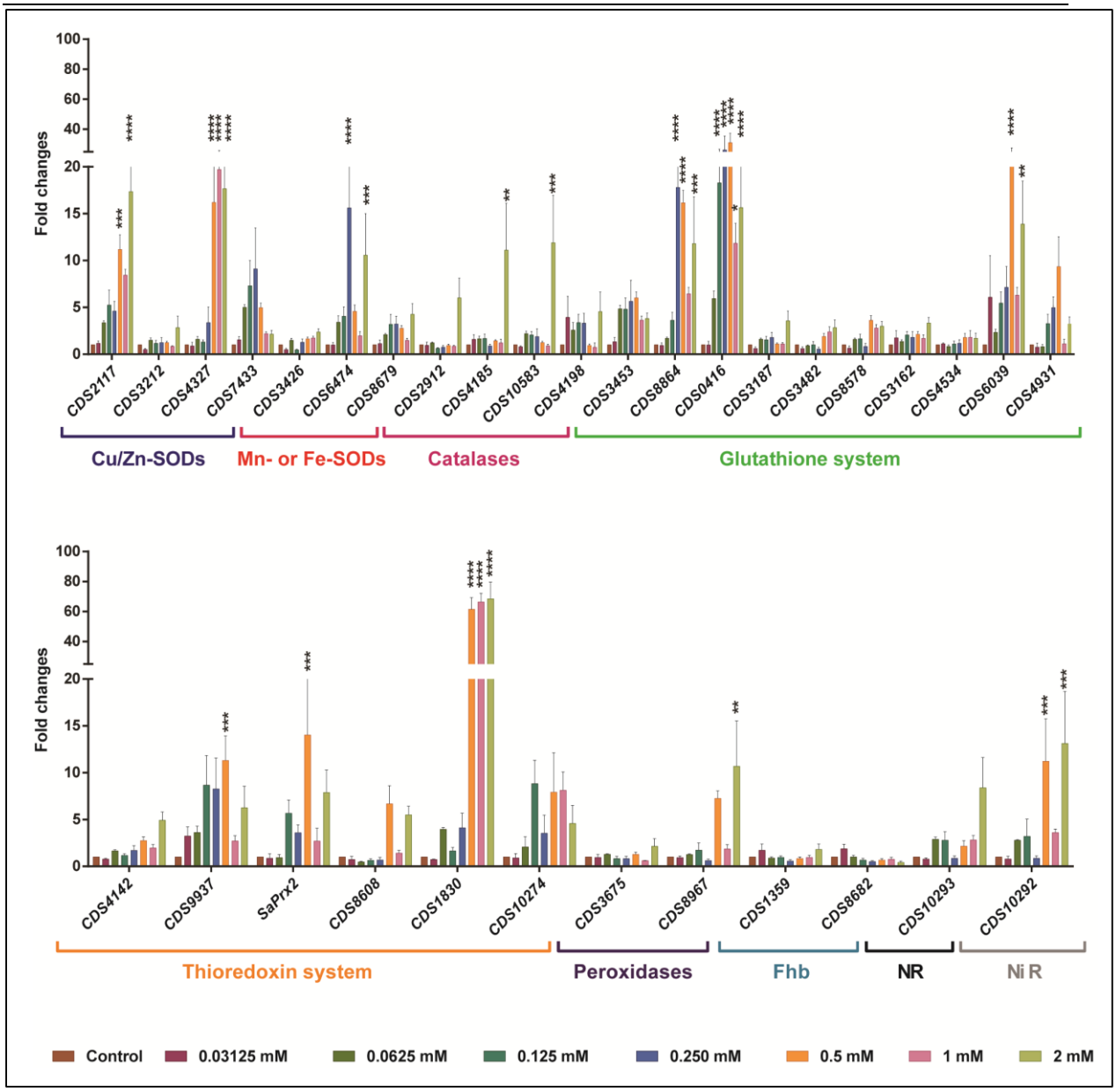


Figure 1: Relative gene expression levels in 24-h-old *S. apiospermum* hyphae after induction of oxidative stress by menadione.

Coding sequences (CDS) are indicated in Genbank database with the prefix SAPIO_ for genome of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 (Vandeputte *et al.* 2014).

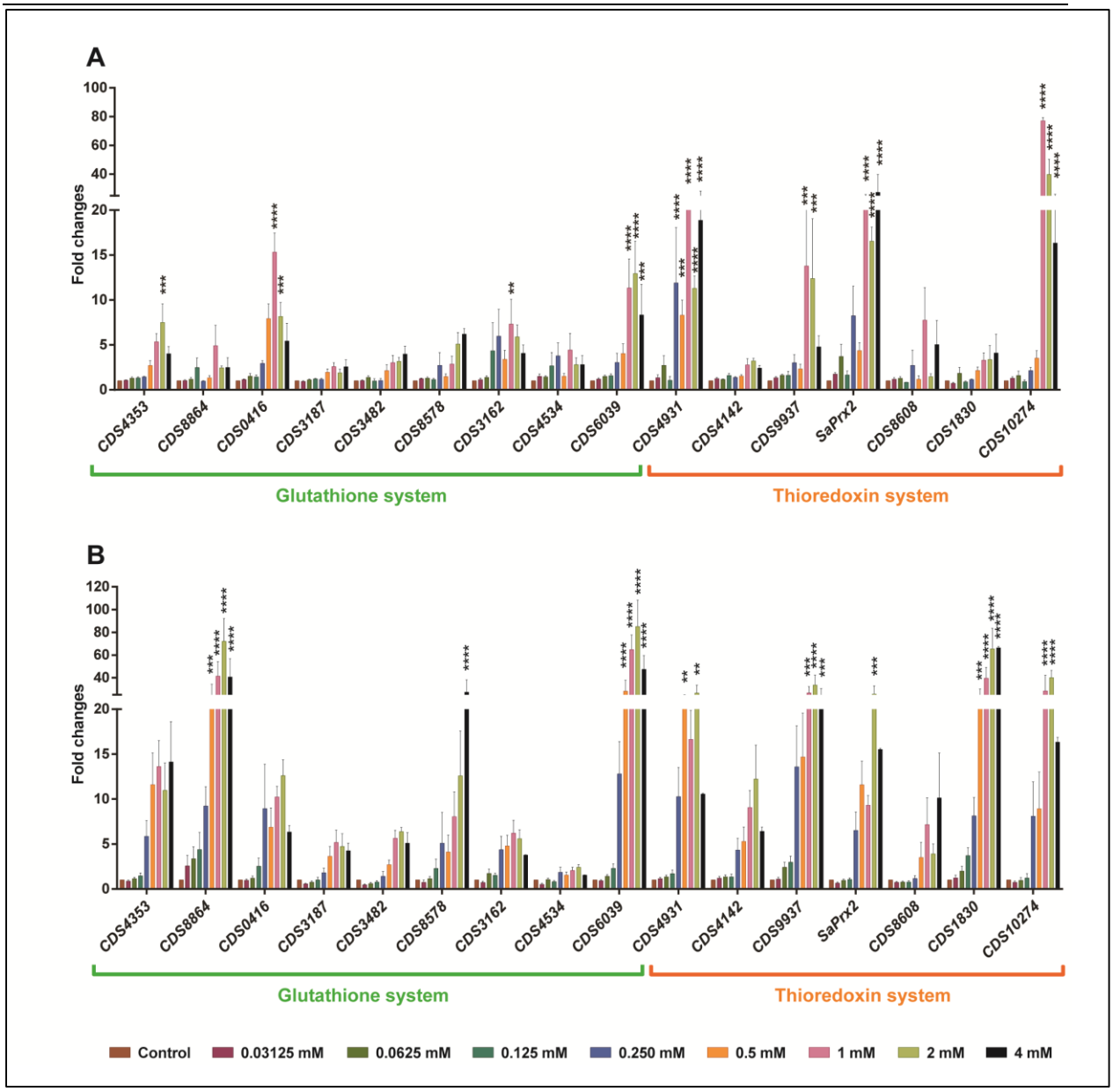


Figure 2: Relative gene expression levels in 24-h-old *S. apiospermum* hyphae after induction of oxidative stress by diamide (A) or hydroperoxide cumene (B).

Coding sequences (CDS) are indicated in Genbank database with the prefix SAPIO_ for genome of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 (Vandeputte *et al.* 2014).

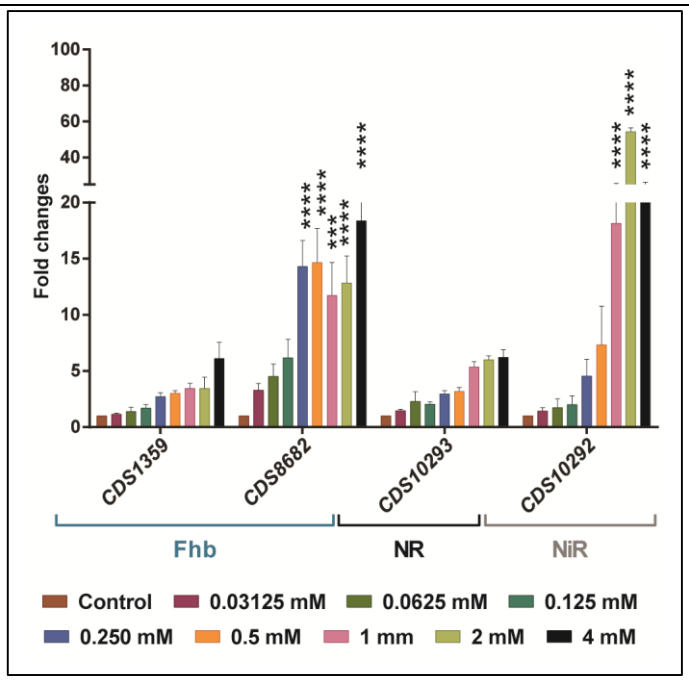


Figure 3: Relative gene expression levels in 24-h-old *S. apiospermum* hyphae after induction of nitrosative stress by DETA NO.

Coding sequences (CDS) are indicated in Genbank database with the prefix SAPIO_ for genome of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 (Vandeputte *et al.* 2014).

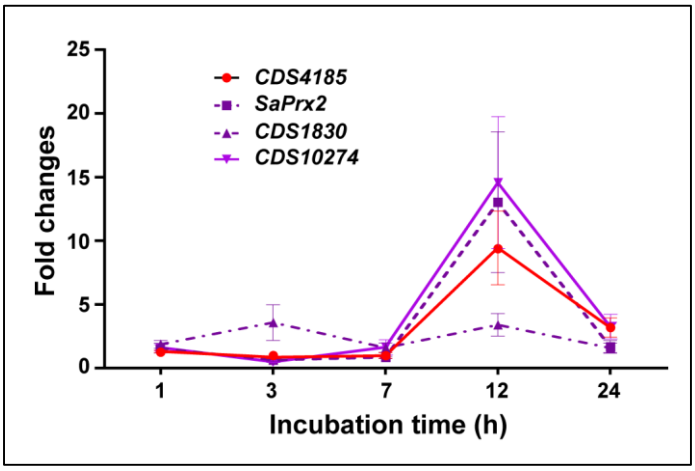


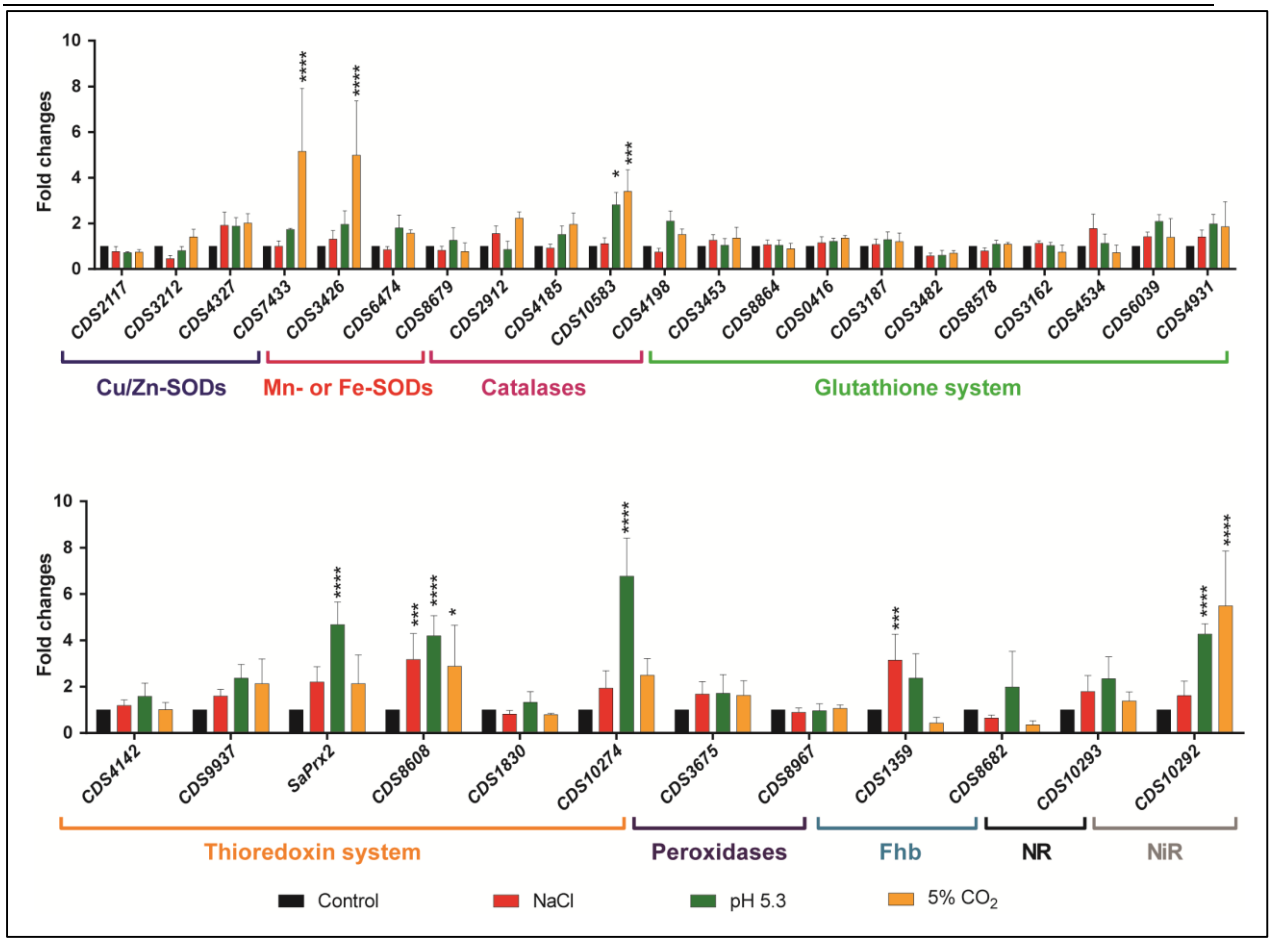
Figure 4: Relative gene expression levels in 24-h-old *S. apiospermum* hyphae co-cultivated with LPS-activated THP-1 macrophages.

Coding sequences (CDS) are indicated in Genbank database with the prefix SAPIO_ for genome of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 (Vandeputte *et al.* 2014) except for *SaPrx2*, which was not considered as a coding sequence in the draft genome sequence of *S. apiospermum,* and was identified by a blastn analysis of the whole genome.

Supplemental Table: List of primers used in RT-qPCR experiments.

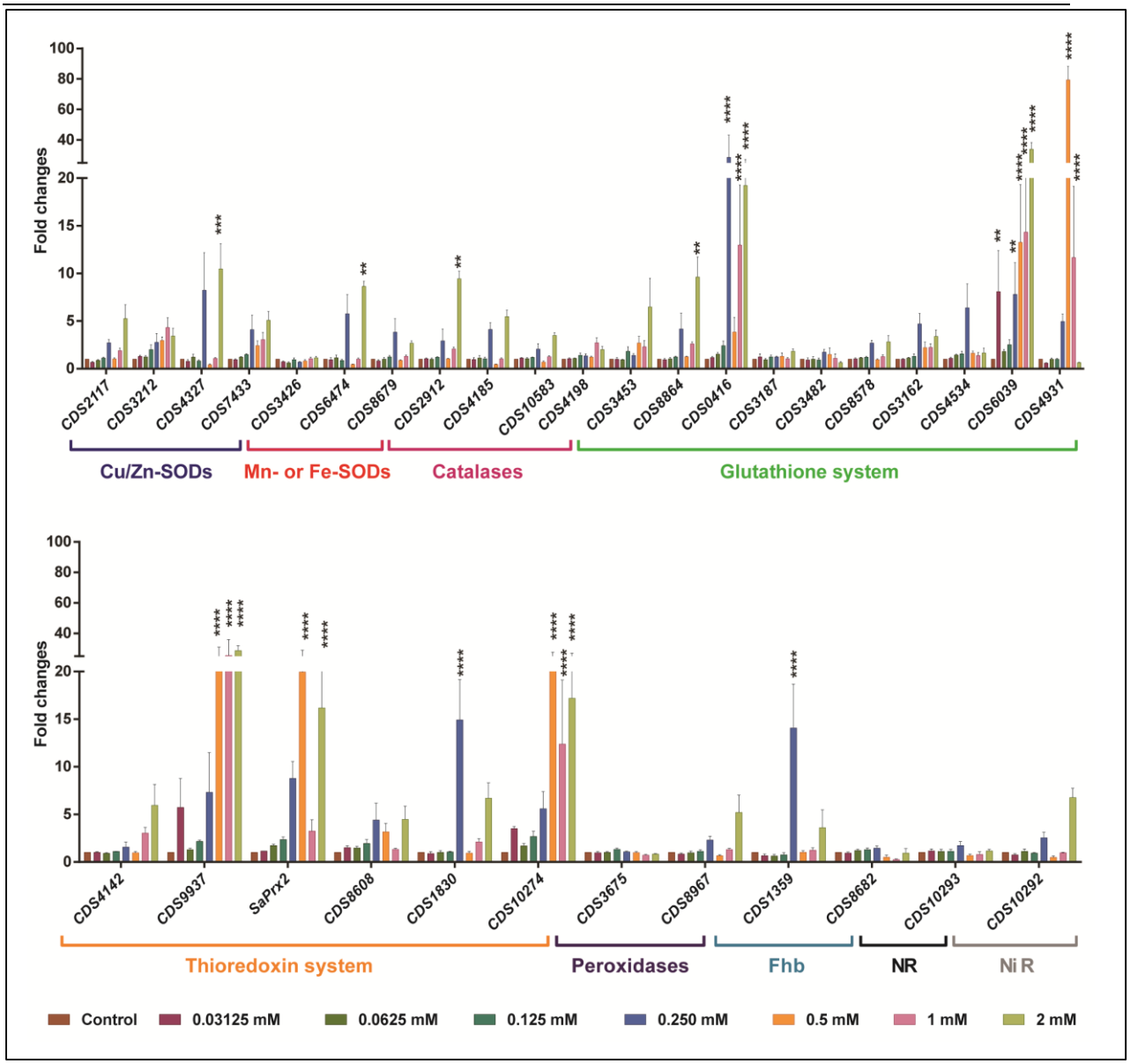
Target gene	Forward primer (5'—3')	Tm (°C)	Reverse primer (5'—3')	Tm (°C)
Cu/Zn-SODs				
CDS2117	GGGTCCCTTGAAGAATGATGAG	62	GAACACGAACACACGGTCTTA	62
CDS3212	GACACTTACGTTGATCCCTACG	62	CGAAGTTTGCGCAGGTAATG	62
CDS4327	GGAAGCACGGTACGATTGA	62	GATGGACTTGTCACCGAAGAA	62
CDS7433	CGTCACCGATAGCCTTGTC	62	GTCTTCAGACTCTCCTCGTTTC	62
Mn-SODs				
CDS3426	AGTCCAGAGATCCCTCCATAC	62	ACTGCGTCCATGCCATATC	62
CDS6474	TTAGAGAGCAGCCTTTAGAACC	62	GGCGGCCTATGTTGAGAATA	62
CDS8679	CCTACTACCTCCAGTACGAGAA	62	GGGCAACAGTCTTCCAGTTA	62
Catalases				
CDS2912	GCCTCTTCTACAACTCCCTTAC	62	GACCGTGTCGGACTTGATATT	62
CDS4185	CATGAACTTTGGCGACAACTATG	62	GTCGATATAGGCCCGTTCTTTC	62
CDS10583	TCTCATTGCTGGTGGACATAC	57	TGCCGCTACGATAACCATTC	57
CDS4198	AGAATGCCGAGCCCATTATC	62	ATCAAAGCGGAGCGAAAGA	62
Glutathione system				
CDS4353	CAAGAAGGTCATCCGAACCA	62	TCTGGAGGGAGTCGACAATA	62
CDS8864	TACAAAGGCAAAGTCGTCCTC	62	GCTTGATCTCGTTCCAGACTT	62
CDS0416	CCAAGTCGTACTGTCCTTACTG	62	GTCGGGCAACTGGTCAA	62
CDS3187	CATGAGGCAGAGCAGGAATTA	61	GCGGAGGATCAATGACGTATC	62
CDS3482	CCCGTTATCCATATCAGCAAGAG	62	CTCCTCAACAGCCTTCATCTTAG	62
CDS8578	GCAGGGCATCAAGGAGTATT	62	ATGTCACAGCCGCCAATAA	62
CDS3162	CCAATCGGCAAACTCCTTGA	63	TGGTTTCTCGCGACAGATG	62
CDS4534	CCTGCTCAACAACTCTCATCTC	62	ACTGGTCTTTCGCCTTCATC	62
CDS6039	CAAGAGGCTAAACGGGATCTAC	62	GTCGTCGGTGGTAACTTCAA	62
CDS4931	CCGAAGCAGCGGGAATAAA	62	ACCCTTCACATCACCCATTC	62
Thioredoxin system				
CDS4142	CGTCCTCCTCTTCTACCCTATG	62	GTGGTGTTGATGTCACGGAA	62
CDS9937	CCGACAAGAAGGTCGTCATC	62	ACATGGTCAACACCCTTAGC	62
SaPrx2	AAATCCACTCACCACCATTCT	62	AAACAGTCCTTACTCAGTCTCATC	62
CDS8608	CCTCGAGGAGAAGACGATTAAG	61	CAGCTCGTCAGACCAAGAA	61
CDS1830	ACCGAGAATGTCACCCTGTA	62	GACGTGAATCCTGCCACTTT	62
CDS10274	CCTCGACTTCTGGGACAATATG	62	CACCCATCAACAGGTAGTTCTC	62
Cytochrome C peroxidase				
CDS3675	ATCAAGGAGTTCAAGCCTACC	62	GTAGCTTCCGTCATCGTACTC	62
Chloro-peroxidase				
CDS8967	GAGAATGAGCGTTTCCCTACAG	62	CTTGTCGCTTCCCGAATCAT	62
Flavohemoglobin				
CDS1359	GACCAGATGTACCGCATGTT	62	GGAGTGAGGTAGAACGAGTAGA	62
CDS8682	CTACATCGACGACCTTCCTAAG	61	GCTCGCCAACAATAGCATAC	61
Nitrate reductase				
CDS10293	GCAAGAAATCCAGATGACGAATC	55.3	ACGTGACCGTCCACAATAAA	58.1
Nitrite reductase				
CDS10292	CCCGCCTAGTCAGTTCATATTAG	62	ATCACCCTTGGTGACGTTATAG	62
Control				
Actin	CCCTTGACTTTGAGCAGGAGATCCA	62	CTCAAGACCGAGGACAGAGGGCTG	62
GAPDH	TCAACGGTTTCGGTCGTATC	62	GCGTACTTGGTCTCGATGAA	62

Coding sequences (CDS) are indicated in Genbank database with the prefix SAPIO_ for genome of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 (Vandeputte *et al.* 2014) except for *SaPrx2*, which was not considered as a coding sequence in the draft genome of *S. apiospermum*, and was identified by a blastn analysis of the whole genome.



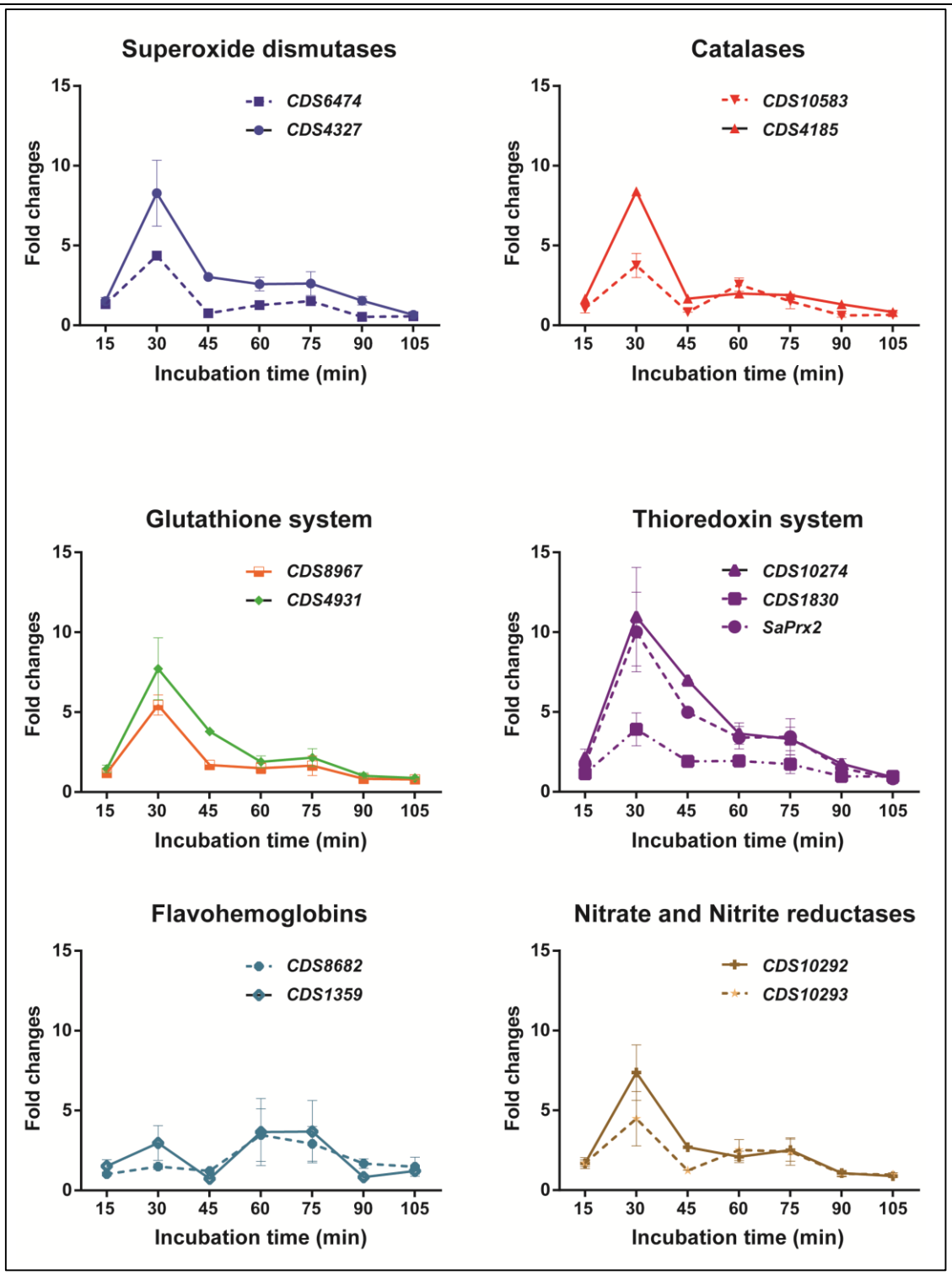
Supplemental Figure 1: Relative gene expression levels in 24 h-old *S. apiospermum* hyphae exposed to 90 mM NaCl, acid pH (pH 5.3) or 5% CO_2.

Coding sequences (CDS) are indicated in Genbank database with the prefix SAPIO_ for genome of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 (Vandeputte *et al.* 2014). *SaPrx2*, not considered as a coding sequence in the draft genome sequence of *S. apiospermum,* was identified by a blastn analysis of the whole genome.



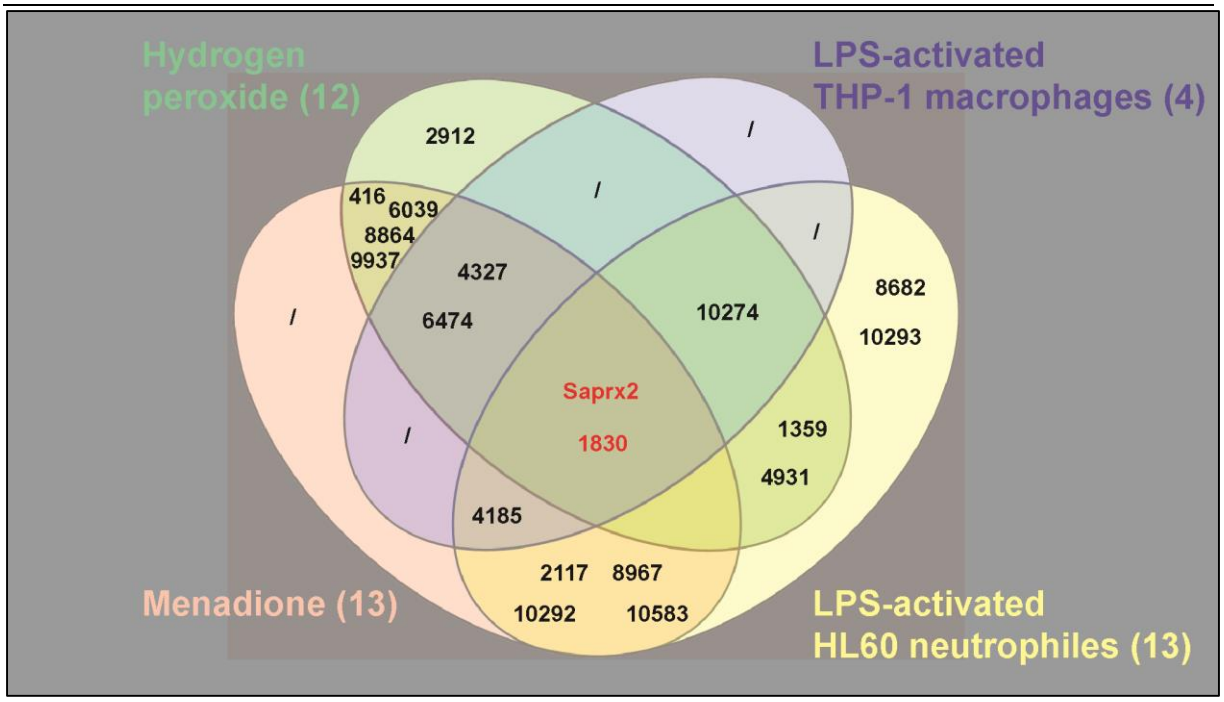
Supplemental Figure 2: Relative gene expression levels in 24-h-old *S. apiospermum* hyphae after induction of oxidative stress by hydrogen peroxide

Coding sequences (CDS) are indicated in Genbank database with the prefix SAPIO_ for genome of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 (Vandeputte *et al.* 2014). *SaPrx2*, not considered as a coding sequence in the draft genome sequence of *S. apiospermum,* was identified by a blastn analysis of the whole genome.



Supplemental Figure 3: Relative gene expression levels in 24-h-old *S. apiospermum* hyphae co-cultivated with LPS-activated HL60 neutrophils

Coding sequences (CDS) are indicated in Genbank database with the prefix SAPIO_ for genome of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 (Vandeputte *et al.* 2014) except for *SaPrx2*, which not considered as a coding sequence in the draft genome sequence of *S. apiospermum,* and was identified by a blastn analysis of the whole genome.



Supplemental Figure 4: Venn representation of the genes significantly overexpressed in response to a general stress induced chemically (menadione or hydrogen peroxide) or generated by phagocytic cells.

Accession numbers of the coding sequences (preceded in the Genbank database by the prefix SAPIO_CDS) that were significantly overexpressed in the different experimental conditions studied, are indicated. Only two CDS (in red and bold font) were overexpressed in each of the four conditions illustrated here. *SaPrx2*, which not considered as a coding sequence in the draft genome sequence of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 (Vandeputte *et al.* 2014), was identified by a blastn analysis.

5. Construction de mutants défectifs de gènes de détoxification des ROS chez *Scedosporium apiospermum*

Introduction

L'établissement d'une infection repose sur les capacités du pathogène à échapper aux défenses immunitaires de l'hôte. L'un des mécanismes de défense est la libération de ROS par les cellules phagocytaires. Afin de se protéger contre ce stress oxydatif, les pathogènes ont développé des systèmes de protection, notamment diverses enzymes qui pourraient constituer des cibles thérapeutiques compte tenu de leur importance pour le succès de l'infection.

L'analyse bio-informatique du génome de *Scedosporium apiospermum* a permis d'identifier une batterie de 33 gènes codant des protéines connues comme participant à la réponse contre le stress oxydatif et azoté dans d'autres modèles cellulaires (Staerck *et al.* 2017b). L'analyse transcriptionnelle de ces gènes dans différentes conditions de stress oxydatif a permis d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la réponse des hyphes au stress oxydatif. Dans nos conditions expérimentales, 12 de ces gènes ne voient pas leur expression modifiée dans différents traitements. Certains d'entre eux pourraient néanmoins jouer un rôle pour d'autres stades morphologiques, notamment le gène *CDS3212* qui code une Cu/Zn-SOD à ancre GPI exprimée uniquement en surface des spores (Ghamrawi *et al.* 2015). Parmi les gènes surexprimés en réponse à un stress oxydatif induit par voie chimique, deux gènes codent des SOD (*CDS4327*, *CDS6474*) et deux autres des catalases (*CDS4185*, *CDS10583*), 4 appartiennent au système de la thiorédoxine (*CDS9937*, *CDS1830*, *CDS10274*, *Sa*Prx2), 1 gène code une chloroperoxydase (*CDS8967*), 2 des flavohémoglobines *(CDS1359*, *CDS8682*), et 1 une nitrite réductase (*CDS10292*). Seuls quatre gènes codant une catalase, une peroxyrédoxine et les deux thiorédoxine réductases sont surexprimés lors d'un stress induit par la ménadione ou le peroxyde d'hydrogène comme en co-culture avec les deux types de cellules phagocytaires.

Les thiorédoxine réductases qui occupent une position centrale dans le système de la thiorédoxine ont été largement étudiées chez les microorganismes, où elles participent à la réponse au stress oxydatif, au maintien du statut rédox et à la croissance. Chez *Candida albicans,* la thiorédoxine réductase (Trr1) participe à la protection contre le stress oxydatif induit par les cellules phagocytaires et est impliquée dans les récurrences des candidoses vaginales (Kusch *et al.* 2007; Godoy *et al.* 2015; Ratti *et al.* 2015). Trr1 a été proposée pour le développement d'un vaccin (Godoy *et al.* 2015). La thiorédoxine réductase GliT d'*Aspergillus fumigatus* est également induite en réponse à un stress oxydatif (Sugui *et al.* 2008). Néanmoins, très peu d'études se sont attachées à démontrer le rôle de ces protéines chez les champignons pathogènes. Chez le phytopathogène *Magnaporthe oryzae*, la délétion du gène *TRR1* codant une thiorédoxine réductase a été réalisée avec succès. Trr1 participe à la réponse au stress oxydatif, et intervient dans la sporulation et la virulence de ce champignon (Fernandez et Wilson 2014). La délétion du gène correspondant chez *Botrytis cinerea* entraîne une réduction de la croissance, une hypersensibilité au

stress oxydatif, ainsi qu'un retard de la germination associé à un défaut de virulence (Viefhues *et al.* 2014; Belmondo *et al.* 2017). Chez *Beauveria bassiana*, deux thiorédoxine réductases ont été identifiées (Trr1, Trr2). La délétion du gène *TRR1* se traduit par une sensibilité accrue au stress oxydatif et aux chocs thermiques, et une diminution de l'aptitude à la sporulation, effets qui ne sont pas retrouvés pour le mutant *ΔTrr2* (Zhang *et al.* 2016). Les mêmes auteurs n'ont cependant pas réussi à obtenir des doubles mutants, suggérant que ces deux protéines pourraient être essentielles, l'une au maintien du statut rédox et l'autre au cycle de vie du champignon. Des mutants des thiorédoxine réductases ont également été obtenus pour *Saccharomyces cerevisiae* et *Schizosaccharomyces pombe,* présentant une hypersensibilité au stress oxydatif (Machado *et al.* 1997; Pedrajas *et al.* 1999; Park *et al.* 2012). Enfin, la Trr1 est essentielle à la viabilité de *Cryptococcus neoformans* (Missall et Lodge 2005), comme cela a été démontré également pour *Plasmodium falciparum* (Krnajski *et al.* 2002) ou encore *Staphylococcus aureus* (Uziel *et al.* 2004).

Les catalases et les SOD participent également au maintien de l'environnement redox intracellulaire chez de nombreux champignons (Hamilton *et al.* 1996; Holdom *et al.* 1996; Hwang *et al.* 1999, 2002; Narasipura *et al.* 2003; Youseff *et al.* 2012).

Enfin, les gènes codant ces enzymes sont sous le contrôle de régulateurs transcriptionnels de la famille des *bZIP leucine zipper*. Ces facteurs de transcription ont été décrits chez de nombreux champignons comme assurant un rôle dans la protection contre le stress oxydatif. La famille des *bZIP* regroupe plusieurs protéines ayant des fonctions biologiques distinctes et réparties dans des clades distincts. Ainsi, il a été identifié, 13 protéines de la famille *bZIP* chez *S. cerevisiae*, 21 chez *M. oryzae et Fusarium graminearum*, 17 chez *Aspergillus nidulans,* et 13 chez *B. cinerea Stagonospora nodorum* et chez *Neurospora crassa* (Tang *et al.* 2015). Parmi ces facteurs de transcription, des protéines appelées Yap1 pour *yes-associated-protein* ou encore AP-1 pour *associated-protein* ont été décrites chez divers champignons. Le facteur de transcription Yap1 de *S. cerevisiae* a été le premier identifié ; c'est un acteur majeur de la réponse au stress oxydatif chez la levure, puisqu'il régule l'expression de nombreux gènes impliquées dans la détoxification des ROS (Toone *et al.* 2001). L'invalidation du gène codant se traduit par une sensibilité accrue aux agents oxydants et aux antifongiques (Alarco et Raymond 1999). Des homologues de Yap1 ont ensuite été caractérisés chez de nombreux Ascomycètes pathogènes de l'homme, ou de végétaux pour lesquels ils sont impliqués dans la réponse aux stress oxydatif **(Tableau VI)**. Chez *Alternaria alternata*, le gène *YAP1* est impliqué dans la régulation de la synthèse de la glutathion réductase, de la catalase, de la glutathion peroxydase et des SODs (Chen *et al.* 2017). La délétion du gène *YAPA* de *Talaromyces marneffei* entraîne une diminution de l'activité des SODs et glutathion réductases (Dankai *et al.* 2016). Chez *Colletotrichum gloeosporioides, CgAP1* intervient dans la régulation de la synthèse de la catalase, la glutathion peroxydase et la glutathion réductase (Sun *et al.* 2016). Chez d'autres organismes, Yap1 est également impliqué dans la régulation de l'expression d'alkyl hydroxyde réductases, de peroxyrédoxine, des thiorédoxines, ou encore de cytochrome C peroxydases (Lee *et al.* 1999; Gasch *et al.* 2000; Dumond *et al.* 2000; Molina et Kahmann 2007; Temme et Tudzynski 2009; Reverberi *et al.* 2012; Montibus *et al.* 2013).

Le rôle de ces facteurs de transcription dans la réponse au stress oxydatif est universel, mais leur rôle dans la pathogénicité reste discuté. En effet, chez certains phytopathogènes comme *B. cinerea* (Temme et Tudzynski 2009), *C. gloeosporioides* (Sun *et al.* 2016; Li *et al.* 2017) ou encore *M. oryzae* (Guo *et al.* 2011), il est essentiel à la virulence **(Tableau VI)**. Inversement, il ne participe pas à la virulence chez d'autres phytopathogènes, notamment *Epichloe festucae* (Cartwright et Scott 2013), *Fusarium graminearum* (Montibus *et al.* 2013), ou encore *Zymoseptoria triticis* (Yang *et al.* 2015). **(Tableau VI)**. Chez *A. fumigatus, YAP1* ne serait pas impliqué dans la virulence selon certains auteurs (Lessing *et al.* 2007; Qiao *et al.* 2008), alors que d'autres aboutissent à une conclusion diamétralement opposée (Leal *et al.* 2012).

Afin de préciser l'importance de certains gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif chez *S. apiospermum*, nous avons tenté de produire des mutants défectifs. Notre attention s'est portée sur six gènes du système du glutathion (*CDS6039*, *CDS0416*, *CDS8864*) ou de la thiorédoxine (*CDS10274*, *CDS1830*, *CDS9937*) surexprimés dans certaines des conditions de stress oxydatif que nous avions précédemment étudiées, ainsi que sur les gènes codant la Cu/Zn-SOD à ancre GPI (*CDS3212*) et le facteur de transcription *Sa*Yap1 (*CDS9352*).

Tableau VI: Ascomycètes présentant un homologue de Yap1 de *S. cerevisiae* et phénotypes étudiés.

Espèces	Croissance	Formation d'hyphes	Sporulation	Stress oxydant	Stress osmotique	Résistance aux antifongiques	Survie dans le macrophage	Virulence	Références
A. alternata	+		-	+	-			+	Yang *et al.* 2009; Lin *et al.* 2009, 2011
A. fumigatus				+	-	+		+ / -	Lessing *et al.* 2007; Qiao *et al.* 2008, 2010; Leal *et al.* 2012
A. nidulans				+	-				Asano *et al.* 2007
A. ochraceus	+		+	+					Reverberi *et al.* 2012
A. parasiticus				+					Reverberi *et al.* 2007, 2008
B. cinerea				+	-			+	Temme et Tudzynski 2009
C. albicans				+		+		+	Alarco et Raymond 1999; Wang *et al.* 2006; Gónzalez-Párraga *et al.* 2010; Jain *et al.* 2013; Dai *et al.* 2013; Patterson *et al.* 2013; Komalapriya *et al.* 2015; Kos *et al.* 2016
C. heterostrophus				+				-	Lev *et al.* 2005; Ronen *et al.* 2013
C. gloeosporioides	-	-	-	+	-			+	Sun *et al.* 2016; Li *et al.* 2017
Cr. neoformans				+		+			Paul *et al.* 2015
E. festucae				+				-	Cartwright et Scott 2013
E. gossypii				+					Kavitha et Chandra 2014
F. graminearum	+		+	+	+			-	Montibus *et al.* 2013
K. lactis				+					Billard *et al.* 1997
M. oryzae	+	+	+	+				+	Guo *et al.* 2011
M. fructicola				+				-	Yu *et al.* 2017
N. crassa				+					Takahashi *et al.* 2010; Tian *et al.* 2011
S. cerevisiae				+		+		+	Jain *et al.* 2009
S. pombe				+		+			Toone *et al.* 1998
T. marneffei	+	+	+	+			+		Dankai *et al.* 2016
Z. tritici			-	+				-	Yang *et al.* 2015

A. alternata : Alternaria alternata ; A. fumigatus : Aspergillus fumigatus ; A. nidulans : Aspergillus nidulans ; A. ochraceus : Aspergillus ochraceus ; A. parasiticus : Aspergillus parasiticus ; B. cinerea : Botrytis cinerea ; C. albicans : Candida albicans ; C. heterostrophus : Cochliobolus heterostrophus ; C. gloeosporioides : Colletotrichum gloeosporioides ; Cr. neoformans : Cryptococcus neoformans ; E. festucae : Epichloe festucae ; E. gossypii : Eremothecium gossypii ; F. graminearum : Fusarium graminearum ; K. lactis : Kluyveromyces lactis ; M. oryzae : Magnaporthe oryzae ; M. fructicola : Monilinia fructicola ; N. crassa : Neurospora crassa ; S. cerevisiae : Saccharomyces cerevisiae ; S. pombe : Schizosaccharomyces pombe ; T. marneffei :Talaromyces marneffei ; Z. tritici : Zymoseptoria tritici.

Matériels et méthodes

Souches fongiques

La construction des mutants a été effectuée à partir de la souche *S. apiospermum* IHEM 14462, souche précédemment utilisée dans le laboratoire pour le séquençage du génome de *S. apiospermum* (Vandeputte *et al.* 2014) et dont le gène *Ku70* codant la sous-unité I de l'hélicase II ATP dépendante a été délété. Ce gène participe au système de réparation de l'ADN et sa mutation permet de limiter les recombinaisons aléatoires particulièrement fréquentes chez *S. apiospermum*, et ainsi d'obtenir un taux de recombinaison homologue élevé comme décrit pour d'autres champignons filamenteux (Ninomiya *et al.* 2004; Krappmann *et al.* 2006; Nayak *et al.* 2006; Ushimaru *et al.* 2010).

Cette souche est maintenue par culture à 37°C durant 9 à 14 jours sur milieu Potatoe Dextrose Agar (PDA) supplémenté en chloramphénicol 0,5% et en phléomycine 20 µg/mL pour maintenir la pression de sélection, ce marqueur ayant été utilisé pour sélectionner les transformants *Ku70*Δ. Les mutants sur les gènes d'intérêt sont cultivés sur milieu PDA additionné d'hygromycine 50 µg/mL (seul autre marqueur de sélection applicable pour les *Scedosporium*), durant 9 à 14 jours à 37°C. Les souches fongiques sont conservées sous forme de suspensions de spores à - 80°C en glycérol 20%.

Pour certaines expériences, les cultures sont réalisées en milieu liquide YPD sans antibiotique, inoculé à raison de 10^6 spores/mL. Les tubes germinatifs ou les hyphes issus de ces cultures sont récupérés par filtration sur membranes de nylon d'une porosité de 20 µm.

Souches bactériennes et plasmides

La souche bactérienne *E. coli okayama DH5α* utilisée pour la production des cassettes de délétion est conservée à - 80°C en diméthyl sulfoxyde (DMSO) 7%. Le plasmide pan7.1, porteur des gènes de résistance à l'hygromycine et à l'ampicilline a été utilisé pour la construction des cassettes de délétion pour *S. apiospermum* **(Figure 20)**. Les isolats d'*E. coli okayama DH5α* ayant intégré une construction plasmidique sont ensemencés sur milieu Luria Broth (LB) gélosé (contenant en g/L : tryptone, 10 ; Extrait de levure, 5 ; NaCl, 10) additionné d'ampicilline 100 µg/mL.

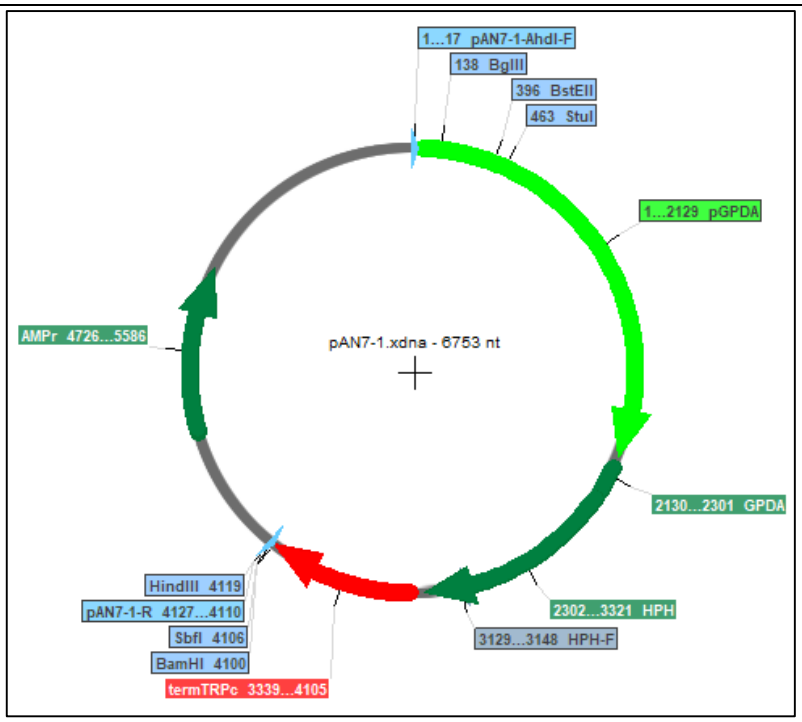


Figure 20: Carte de restriction du plasmide pAN7.1 utilisé pour la production des cassettes de délétion par clonage.

Les séquences correspondant aux extrémités 5'UTR sont insérées au niveau du site de clonage du plasmide aux sites *Bgl*II-*BstE*II, *Bgl*II-*Stu*I ou *BstE*II-*Stu*I. Celles correspondant aux extrémités 3'UTR sont insérées au niveau des sites *BamH*I-*Sbf*I, *BamH*I-*Hind*III ou *Sbf*I-*Hind*III. *AMP*r : gène de résistance à l'ampicilline ; *HPH* : gène de résistance à l'hygromycine ; pGPDA : promoteur du gène codant la glycéraldéhyde-3-phosphate d'*Aspergillus nidulans* ; termTRPc : terminateur du gène indole-3-glycérolphosphate synthase *d'A. nidulans.* Les sites de restriction des enzymes *BamH*I, *Bgl*II, *BstE*II, *Hind*III, *Sbf*I, *Stu*I sont indiqués.

Extraction d'ADN plasmidique

L'extraction d'ADN plasmidique est réalisée par lyse alcaline à partir des souches d'*E. coli* ayant intégré une construction, pour vérification par digestion enzymatique. Les clones bactériens transformés et sélectionnés sur gélose LB additionnée d'ampicilline, sont mis en culture dans 3 mL de milieu LB additionné de 100 µg/mL d'ampicilline. Après incubation pendant 18 h à 37°C, la culture est centrifugée (4600 rpm, 5 min), puis le culot est repris dans 200 µL de tampon Tris-EDTA (Tris-HCl 50 mM, EDTA 1 mM ; Complete EDTA free, Roche, France) additionné de RNase 0,1 mg/mL. Les bactéries sont alors lysées par addition de 200 µL d'une solution alcaline à base de NaOH 8 g/L, contenant du dodécyl sulfate de sodium (SDS) 1%. Après 2 à 5 min d'incubation, la suspension est neutralisée par addition d'acétate de potassium 38 mM, pH 4,8. Les débris bactériens sont éliminés par centrifugation (4600 rpm, 15 min). Les ADN plasmidiques contenus dans le surnageant sont précipités avec 2 volumes d'éthanol 100%. Le mélange est incubé pendant 15 min à - 20°C, avant d'être centrifugé (15000 rpm, 10 min, 4°C). Les culots sont enfin lavés avec de l'éthanol 70% et repris dans 50 µL de tampon Tris-EDTA, et conservés à - 20°C.

Extraction d'ADN génomique fongique

Les ADN sont extraits à partir de colonies sur milieu gélosé (PDA additionné ou non d'antifongique en fonction de la souche étudiée), ou à partir de culture en milieu YPD incubé 2 à 4 jours sous agitation douce (150 rpm, 37°C). Le mycélium est broyé en azote liquide, et le broyat obtenu est repris dans 5 mL de tampon de lyse (Tris-HCl 10 mM pH 8, additionné d'EDTA 1 mM, Triton X100 2%, SDS 1%, NaCl 0,1 M).

L'ADN est ensuite extrait par addition de 5 mL de phénol:chloroforme:isopropanol (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri). Le mélange est ensuite centrifugé (4600 rpm, 30 min). Du chloroforme/isopropanol (Sigma-Aldrich ; 5 mL) est ajouté au surnageant. Après centrifugation (4600 rpm, 30 min), les ADN sont précipités par addition au surnageant de 2 volumes d'éthanol 100% (30 min, - 20°C). Après centrifugation (15000 rpm, 10 min), le culot est lavé en éthanol 70%. Une fois l'éthanol éliminé, le culot est repris dans 500 µL de Tris-EDTA additionné de RNase A 0,2 mg/mL. Après incubation pendant 1 h à 37°C, l'ADN est à nouveau précipité par addition de 500 µL d'isopropanol. Le précipité est lavé en éthanol 70%, et après évaporation de l'éthanol, l'ADN génomique est repris en tampon Tris-EDTA et conservé à 4°C.

Dosage des ADN

Le dosage des ADN est effectué au fluorimètre Qubit® (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) sur 1 à 20 µL d'échantillon dilué dans un volume réactionnel de200 µL. Cette technique est basée sur l'addition d'un réactif fluorescent qui forme un complexe avec les acides nucléiques dont la concentration peut être évaluée après calibration du fluorimètre à l'aide du kit Quant-iT^{TM} dsDNA Broad-range Assay.

Electrophorèse des acides nucléiques

La qualité des acides nucléiques est visualisée sur gel d'agarose à 1% dans du tampon Tris-acétate-EDTA (TAE, Tris-Acétate 20 mM ; EDTA 0,5 mM) additionné de midori green 0,02% (Advance DNA strain ; Nippon Genetics Europe, Dueren, Allemagne). La migration est effectuée en tampon TAE, et les ADN sont visualisés sous rayonnement UV à 254 nm.

Construction de cassettes de délétion par clonage dans le plasmide pAN7.1

La première stratégie mise en œuvre a consisté à produire les cassettes de délétion par clonage. Pour cela des amorces ont été définies pour amplifier des régions d'environ 1 kb correspondant aux régions 5'UTR et 3'UTR du gène cible. Afin d'intégrer ces régions dans le plasmide pAN7.1, des adaptateurs et des sites de restriction (*Stu*I, *Bst*EII, *Bgl*II) sont intégrés à l'extrémité de la région 5'UTR à amplifier. De même, des adaptateurs et des sites de restriction (*BamH*I, *Sbf*I, *Hind*III) sont intégrés à l'extrémité de la région 3'UTR à amplifier **(Tableau VII)**. Les extrémités 5'UTR et 3'UTR de chacun des gènes cibles sont obtenues par PCR avec la Gotaq ADN polymérase (Promega, Fitchburg, Wis). Les PCR sont réalisées selon le protocole suivant : une dénaturation primaire de 1 min à 95°C, suivie de 35 cycles de dénaturation pendant 1 min à 95°C, hybridation pendant 1 min à 62°C et élongation pendant 1 min 30 à 72°C, avec une élongation finale de 10 min à 72°C. Les produits de PCR sont précipités par addition de 0,1 volume d'acétate de sodium et 2 volumes d'éthanol 100%. Après 20 min d'incubation à - 80°C, et centrifugation (15000 rpm, 15 min), les amplifiats sont lavés en éthanol 70%. Les culots sont repris dans 15 µL d'eau.

Une digestion enzymatique est ensuite réalisée à l'aide des enzymes et du tampon appropriés. Les produits de digestion sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% et les fragments sont purifiés à partir du gel à l'aide du kit *Nucleospin gel and PCR Clean-up* (Macherey-Nagel, Düren, Allemagne). Le plasmide est ensuite déphosphorylé sous l'action d'une phosphatase (60 min, 37°C) qui est ensuite inactivée par chauffage à 65°C pendant 10 min (New England Biolabs, Evry, France). Les plasmides et les extrémités 5'UTR digérés sont ligués avec un ratio de 3 inserts pour1 plasmide en présence de tampon de ligation (New England Biolabs) et de T4 DNA ligase (New England Biolabs). Le mélange réactionel est incubé pendant une nuit à 4°C.

Construction de cassettes de délétion par PCR fusion

Pour la PCR fusion, nous avons suivi la méthode décrite par Lambou *et al.* (2010) avec quelques adaptations. Le marqueur de résistance utilisé pour remplacer les gènes à déléter est le gène *HPH* provenant du plasmide pAN7.1. Les amorces utilisées pour amplifier les différentes parties de la cassette de délétion sont présentées dans le **Tableau VIII**. La production de la cassette de délétion a débuté par une première PCR permettant d'amplifier les régions flanquantes 5'UTR (amorces P1 et P2), et 3'UTR du gène cible (amorces P5 et P6) à partir de l'ADN de la souche parentale, et le gène de résistance *HPH* (amorces P3 et P4) sur l'ADN plasmidique. Les amorces P2 et P5 possèdent respectivement une séquence de 30 bases homologues à celles trouvées à l'extrémité 5'UTR du gène *HPH*, et à l'extrémité 3'UTR du gène *HPH* **(Figure 21)**.

Les PCR destinées à amplifier les régions 5'UTR et 3'UTR ont été réalisées à l'aide de la Q5 high fidelity DNA polymérase (NEB) selon le protocole suivant : après une dénaturation initiale de 30 sec à 98°C, 35 cycles ont été réalisés avec dénaturation pendant 10 sec à 98°C, hybridation pendant 30 sec à 56°C (ou 62°C) et élongation pendant 1 min 30 à 72°C, suivis d'une élongation finale de 1 min à 72°C. Les amorces P3 et P4 sont des séquences chimériques de 30 bases correspondant respectivement à l'extrémité 5'UTR et 3'UTR du gène cible. Pour le gène *HPH,* de taille beaucoup plus importante, le protocole d'amplification est légèrement modifié, avec une élongation finale de 2 min à 72°C. Les trois amplicons (5'UTR, gène *HPH* et 3'UTR) sont purifiés sur gel et fusionnés par PCR grâce aux séquences chevauchantes et aux amorces P7 et P8 avec un temps d'élongation de 3 minutes **(Figure 21)**. Les amplicons obtenus sont purifiés sur gel d'électrophorèse. Les cassettes de délétion ainsi obtenues sont dosées, puis précipitées avant d'être utilisées pour transformer la souche parentale.

Tableau VII : Amorces utilisées pour la construction des cassettes de délétion par clonage.

Amorces sens	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)	Amorces antisens	Séquence 5' → 3'	Tm (°C)	Taille des amplicons (pb)
CDS6039-5'UTR-F-*BstE*II	GCGCAAAGGGtgaccCCTACTTTATGGGGCTCTGC	60,5	**CDS6039-5'UTR-R-*Stu*I**	AAAaggcctCGAGGTACAAGCAATTGCGCC	63,3	994
CDS6039-3'UTR-F-*BamH*I	GCGCAAACGCggatccCCGCCATGTACTATGCCATG	60,5	**CDS6039-3'UTR-R-*Sbf*I**	cctgcaggCTGTGGTAGTGGGAGCGTC	61,6	880
CDS3212-5'UTR-F-*BstE*II	GCGCAAAGGGtgaccGCAATAGGCATCCCATGCAT	58,4	**CDS3212-5'UTR-R-*Stu*I**	AAAaggcctGGAGAGTTTGGAGATCAACG	58,4	937
CDS3212-3'UTR-F-*BamH*I	GCGCAAACCAGGGATCCTGCTTGAGAT	60,5	**CDS3212-3'UTR-R-*Sbf*I**	cctgcaggCGGTACTAAGTTCGACGTTG	58,4	859
CDS9352-5'UTR-F-*BstE*II	GCGCAAAGGGtgaccGCTCTCTTGGATATGGTCGT	58,4	**CDS9352 -5'UTR-R-*Stu*I**	AAAaggcctTTTACGAGGTTGATGCGTCG	58,4	1057
CDS9352 -3'UTR-F-*BamH*I	GCGCAAACGCggatccCGTACAGCGACAGGATGT	56,1	**CDS9352-3'UTR-R-*Sbf*I**	cctgcaggACCCAAGAGATGTCAGC	52,4	791
CDS0416-5'UTR-F-*BstE*II	GCGCAAAGGGtgaccCGTCAGGGTGGTAGAATACA	58,4	**CDS0416-5'UTR-R-*Stu*I**	AAAaggcctAATGACGACTGAAGAAGGCG	58,4	1180
CDS0416-3'UTR-F-*BamH*I	GCGCAAACGCggatccGGAGGGGTCTTCTTTTCTT	55,2	**CDS0416-3'UTR-R-*Sbf*I**	cctgcaggACGTCGTCGGCTTTTACG	56,1	920
CDS8864-5'UTR-F-*BstE*II	GCGCAAAGGGtgaccCGGGTCAAAAGCAACGTTTG	58,4	**CDS8864-5'UTR-R-*Stu*I**	AAAaggcctAATGCGTCGCTTCTTGATCG	58,4	989
CDS8864-3'UTR-F-*BamH*I	GCGCAAACGCggatccCGCCTGCGGTGAAACTTAC	59,5	**CDS8864-3'UTR-R-*Sbf*I**	cctgcaggTCAAGCTCCTCGTGTGACTCG	63,3	902
CDS1830-5F-*BstE*II	GgggtgaccCGGAGTATCTTCACTGCGTC	60,5	**CDS1830-5R-*Stu*I**	AAAaggcctGGTTGAACATCTCCTTGAACCG	62,1	902
CDS1830-3F-*BamH*I	CGCggatccGGAGCCCAAAACTGTTAC	53,8	**SAPIO_CDS1830-3R-*Sbf*I**	cctgcaggAAATGTGGAAGATGGTTCGG	56,4	964
CDS9937-5'UTR-F-*Bgl*II	GCGCAAAGGAGAGATCTTGACATCGTTGCCGCTCA	56,1	**SAPIO_CDS9937-5'UTR-R-*BstE*II**	GgggtgaccCATCTAGACCTCGATCTCCG	60,5	1012
CDS9937-3'UTR-F-*Sbf*I	GCGCAAAcctgcaggCGTTGTGACATGATGTCCGT	58,4	**CDS9937-3'UTR-R-*Hind*III**	CCCaagcttTCGCTGCCCGCTGTACTTG	62,5	878
CDS10274-5'UTR-F-*BstE*II	GCGCAAAGggtgaccCGGTGAGTTGGCCTTTAGTT	58,4	**CDS10274-5'UTR-R-*Stu*I**	AAAaggcctGTGAAGCATCGCATTGACCG	60,5	997
CDS10274-3'UTR-F-*BamH*I	GCGCAAACGCggatccCGAGTCTGCCTAGACTTGTT	58,4	**CDS10274-5'UTR-R-*Sbf*I**	cctgcaggAATTACCGCCTTGCCTAACG	58,4	880

En rouge figurent les adaptateurs ajoutés afin de permettre une meilleure reconnaissance du site de restriction figurant en bleu, et en orange la partie de l'amorce s'hybridant sur le brin d'ADN à amplifier.

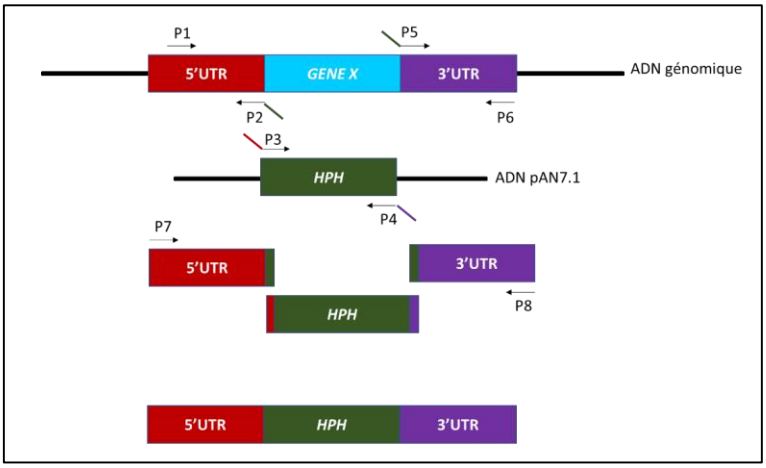


Figure 21 : Construction des cassettes de délétion par PCR fusion.

La PCR fusion est une technique permettant de produire des cassettes de délétion en deux étapes. La première étape consiste à amplifier par trois PCR distinctes les extrémités 5'UTR, 3'UTR et le gène de résistance (ici gène de résistance à l'hygromycine). Deux premières PCR sont réalisées sur l'ADN génomique de la souche parentale, afin d'amplifier les extrémités 5'UTR et 3'UTR respectivement avec les couples d'amorces P1/P2 et P5/P6. Les amorces P2 et P5 comportent des régions flanquantes de 30 bases correspondant aux extrémités du gène *HPH.* En parallèle, une PCR visant à amplifier le gène de résistance à l'hygromycine est réalisée, grâce au couple d'amorces P3/P4. Ces deux amorces possèdent respectivement des régions flanquantes de 30 bases homologues à celles des extrémités 5'UTR et 3'UTR. La deuxième étape consiste à produire la cassette de délétion par amplification à partir des trois produits de PCR obtenus précédemment, à l'aide des amorces P7 et P8 homologues aux séquences des extrémités 5'UTR et 3'UTR.
5'UTR : séquence nucléotidique d'environ 1 kb située en amont du gène cible ; 3'UTR : séquence nucléotidique d'environ 1 kb située en aval du gène cible ; *GENE X* : gène d'intérêt à déléter ; *HPH* : gène de résistance à l'hygromycine ; P1 : amorce sens se fixant sur l'extrémité 5'UTR du gène cible ; P2 : amorce antisens se fixant sur l'extrémité 5'UTR du gène cible avec une région flanquante correspondant aux 30 premières bases du gène *HPH ;* P3 : amorce sens se fixant sur le gène *HPH* avec une région flanquante correspondant aux 30 dernières bases de l'extrémités 5'UTR ; P4 : amorce antisens se fixant sur le gène *HPH* avec une région flanquante correspondant aux 30 premières bases de l'extrémité 3'UTR ; P5 : amorce sens se fixant sur l'extrémité 3'UTR du gène cible ; P6 : amorce antisens se fixant sur l'extrémité 3'UTR du gène cible avec une région flanquante correspondant aux 30 premières bases du gène *HPH.*

Tableau VIII: Amorces utilisées pour la PCR fusion.

Gène cibles et amorces	Séquence 5'➔3'	Tm (°C)	Taille des amplicons (pb)
CDS1830			
P1	ggtgaccCGGAGTATCTTCACTGCGTC	63	794
P2	tcgtgaatcttttaccagatcggaagcaatATCACTTTCTAGGTGGGTTTTAGGGAGCTG	70	
P3	CAGCTCCCTAAAACCCACCTAGAAAGTGATattgcttccgatctggtaaaagattcacga	68	2633
P4	GCTAGTGACTGATAAGAAGAAGAGCAGGCAatcagagcagattgtactgagagtgcacca	68	
P5	tggtgcactctcagtacaatctgctctgatTGCCTGCTCTTCTTCTTATCAGTCACTAGC	70	829
P6	cctgcaggAAATGTGGAAGATGGTTCGG	62	
P7	GCACCCACTTGATCGTGTAA	66	4161
P8	AAGATGGTTCGGAGGATGCT	66	
CDS10274			
P1	ggtgaccCGGTGAGTTGGCCTTTAGTT	63	903
P2	tcgtgaatcttttaccagatcggaagcaatACATGTCTGACACATCACTACACCTTCACC	70	
P3	GGTGAAGGTGTAGTGATGTGTCAGACATGTattgcttccgatctggtaaaagattcacga	68	2633
P4	GAGTCGGGATATAACCCTCGGAGAATAAACatcagagcagattgtactgagagtgcacca	68	
P5	tggtgcactctcagtacaatctgctctgatGTTTATTCTCCGAGGGTTATATCCCGACTC	68	849
P6	cctgcaggAATTACCGCCTTGCCTAACG	64	
P7	GAATTCCAGCTGTTCGGT	63	4399
P8	TAACGTAGTGCACAAGGCTC	63	
CDS9352			
P1	ggtgaccGCTCTCTTGGATATGGTCGT	62	881
P2	tcgtgaatcttttaccagatcggaagcaat GCTCAGCTCAAAAAGAACATTGACGTAGAG	68	
P3	CTCTACGTCAATGTTCTTTTTGAGCTGAGC attgcttccgatctggtaaaagattcacga	68	2633
P4	TTTTTCTTCGCGTATCCACCAAGCATTatcagagcagattgtactgagagtgcacca	68	
P5	tggtgcactctcagtacaatctgctctgatAATGCTTGGTGGATACGCGAAGAAAAA	67	713
P6	cctgcaggACCCAAGAGATGTCAGC	58	
P7	GCGATATCCATCTTGTGCCT	64	4241
P8	CAATAGGATGGGAAGCGAAG	64	
CDS3212			
P1	ATTCATAGACTCAATAATTAGAACTCGACT	64	925
P2	tcgtgaatcttttaccagatcggaagcaatAAATGTAATTTATCTCTTTCAATCCCAAGC	64	
P3	GCTTGGGATTGAAAGAGATAAATTACATTT attgcttccgatctggtaaaagattcacga	68	2633
P4	AATTGATTCTTGTCGATCATTAATTTGGTCatcagagcagattgtactgagagtgcacca	68	
P5	tggtgcactctcagtacaatctgctctgatGACCAAATTAATGATCGACAAGAATCAATT	64	901
P6	GACGTTGTATATATATCCTGGAAGAATCTT	64	
P7	GAAACGCCCGACTAGTTAAATC	64	4448
P8	CTGCAAATGCCAAATTCCAA	64	
CDS9937			
P1	gagatcttTGACATCGTTGCCGCTCA	65	807
P2	tcgtgaatcttttaccagatcggaagcaatCACACACAACTGAGAACGTTTGTAAGCAAT	68	
P3	ATTGCTTACAAACGTTCTCAGTTGTGTGTGattgcttccgatctggtaaaagattcacga	68	2633
P4	AAACCAAAAGTGTGATCTTAAGGAACGCTCatcagagcagattgtactgagagtgcacca	68	
P5	tggtgcactctcagtacaatctgctctgatGATGAGCGTTCCTTAAGATCACACTTTTGGTTT	67	713
P6	aagcttTCGCTGCCCGCTGTACTTG	68	
P7	GTTATCTGCGAATGTCCAGTCC	64	4160
P8	CTGTACTTGCCATGAAGGAG	64	

La partie de l'amorce s'hybridant sur l'ADN génomique de *S. apiospermum* est présentée en majuscules, les extrémités chevauchantes s'hybridant sur la séquence hygromycine en minuscules et en rouge, et les séquences correspondant aux adaptateurs en minuscules et en violet. P1 : amorce sens se fixant sur l'extrémité 5'UTR du gène cible ; P2 : amorce antisens se fixant sur l'extrémité 5'UTR du gène cible avec une région flanquante correspondant aux 30 premières bases du gène *HPH ;* P3 : amorce sens se fixant sur le gène *HPH* avec une région flanquante correspondant aux 30 dernières bases de l'extrémité 5'UTR ; P4 : amorce antisens se fixant sur le gène *HPH* avec une région flanquante correspondant aux 30 premières bases de l'extrémité 3'UTR ; P5 : amorce sens se fixant sur l'extrémité 3'UTR du gène cible ; P6 : amorce antisens se fixant sur l'extrémité 3'UTR du gène cible avec une région flanquante correspondant aux 30 premières bases du gène *HPH.*

Transformation bactérienne

Les bactéries compétentes sont préparées à partir d'une colonie d'*E. coli* cultivée dans 15 mL de LB à 37°C sous agitation (250 rpm). Lorsque l'absorbance à 600 nm atteint 0,8, une subculture est réalisée en milieu Super Optimal Broth (tryptone, 20 g/L ; extrait de levures, 5 g/L ; NaCl, 0,5 g/L ; KCl, 0,186 g/L ; $MgCl_2$, 0,952 g/L ; $MgSO_4$, 1,204 g/L). La culture est incubée à 18°C pendant 24 h à sous agitation douce (120 rpm), puis les bactéries sont récupérées par centrifugation (5500 rpm, 15 min, 4°C). Le culot obtenu est repris dans 160 mL de tampon PIPES pH 6,7 (PIPES, 10 mM ; $CaCl_2$, 15 mM ; KCl, 0,25 M), la suspension est incubée pendant 10 min dans la glace, puis centrifugée (4000 rpm, 10 min, 4°C). Le culot est remis en suspension dans 40 mL de tampon PIPES. Après une nouvelle incubation de 10 min dans la glace et centrifugation, le surnageant est éliminé et les bactéries compétentes sont remises en suspension dans 3 mL de DMSO. La suspension obtenue est conservée sous forme d'aliquotes (600 µL) à - 80°C.

Pour la transformation, les produit de ligature (10 µL) sont mis en présence de la suspension de bactéries compétentes (100 µL). Le mélange est incubé pendant 30 min dans la glace, puis pendant 5 min à 37°C pour induire un choc thermique. Les bactéries sont incubées pendant 1 h à 37°C dans 1 mL de LB, la suspension est centrifugée (4000 rpm, 5 min) et le culot obtenu est repris dans 50 µL de LB et ensemencé sur milieu sélectif adéquat.

Transformation de *S. apiospermum*

La transformation est réalisée sur des protoplastes issus de tubes germinatifs de 24 h de la souche *IHEM 14462:Ku70*Δ selon les protocoles de Turgeon *et al.* (2010) et de Liu et Friesen (2012). Les tubes germinatifs sont récupérés sur filtre miracloth de 20 µm de porosité et incubés (120 rpm, 210 min, 37°C) dans une solution de OM/glucanex ($MgSO_4$, 1,2 M ; Na_2HPO_4, 10 mM, pH 5,8 ; glucanex, 12,5 g/L) pour digérer les polysaccharides de paroi. Une solution de sorbitol 1,2 M en tampon Tris-HCl 10 mM est ensuite ajoutée pour maintenir une pression osmotique appropriée, puis la suspension obtenue est centrifugée (2000 rpm, 20 min, 4°C). Les protoplastes situés à l'interface sont remis en suspension en sorbitol 1,2 M en tampon Tris-HCl 10 mM additionné de $CaCl_2$ 10 mM (STC) à 4°C. Après une nouvelle centrifugation (2000 rpm, 20 min), le culot est repris succcessivement dans 9 mL, puis 5 mL et enfin 500 µL de STC froid, avec centrifugation après chaque étape (2000 rpm, 20 min). Les protoplastes sont dénombrés à la cellule de Malassez. Des aliquotes (500 µL à 10^8 protoplastes par mL) sont conservés pour la réalisation des témoins (témoin négatif et témoin de viabilité).

L'ADN transformant (5 µg) est intégré dans les protoplastes restants par fragilisation des membranes aux ions calcium suivi d'un choc thermique en présence de polyéthylène glycol (PEG).

Une solution de PEG 3350 à 60% en Tris-HCl 10 mM, $CaCl_2$ 10 mM (PTC ; 400 µL) est ajoutée en deux fois, avec à chaque fois une incubation de 5 min dans la glace. Puis le choc thermique est réalisé par addition de 800 µL de PTC maintenu à température ambiante, et incubation pendant 5 min à température ambiante. Les protoplastes sont alors incorporés en milieu soft agar (saccharose 1 M, soft agar 1,28%, extrait de levures 0,2%, casaminoacides 0,2%) maintenu en surfusion. Après répartition en boîte de Pétri et incubation pendant 16 h à 37°C, la gélose est recouverte d'une couche de 10 mL de soft agar additionné de 50 µg/mL d'hygromycine (milieu sans hygromycine pour le contrôle de viabilité).

L'invalidation repose sur le principe de la recombinaison homologue illustrée dans la Erreur ! Source du r envoi introuvable.**Figure 22**. Les géloses sont incubées pendant 3 jours à 37°C. Les transformants capables

d'envahir la gélose supérieure contenant l'hygromycine et donc ayant intégré le gène de résistance et donc la cassette de délétion, sont repiqués sur milieu PDA additionné d'hygromycine à 50 µg/mL. Les géloses sont incubées jusqu'à obtention de colonies de 2 à3 cm de diamètre. Les colonies sont alors repiquées sur milieu PDA + hygromycine, puis les transformants sont clonés par dilution limite. Pour chaque transformation, plusieurs clones sont repiqués pour être analysés par Southern blot.

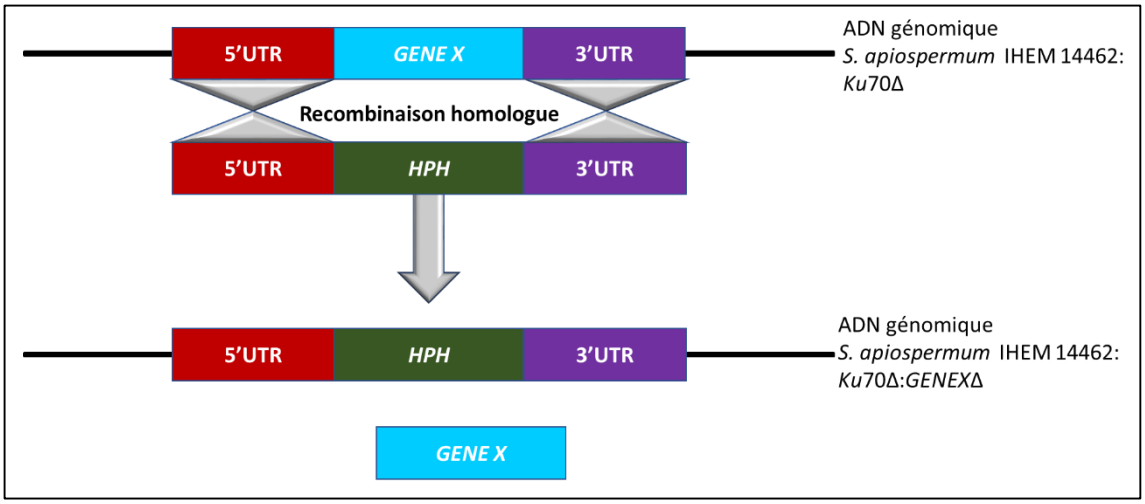


Figure 22 : Principe de la transformation par recombinaison homologue

La recombinaison homologue permet de remplacer dans le génome de la souche parentale le gène cible (*Gène X*) par un gène de résistance (*HPH*) grâce à la reconnaissance en amont et en aval de séquences identiques. 5'UTR : séquence nucléotidique d'environ 1 kb située en amont du gène cible ; 3'UTR : séquence nucléotidique d'environ 1 kb située en aval du gène cible ; *GENE X* : gène d'intérêt à déléter ; *HPH* : gène de résistance à l'hygromycine.

Southern blot

Après extraction de l'ADN des transformants, une première PCR est réalisée pour vérifier l'incorporation du marqueur de sélection (gène *HPH*), suivie d'un Southern blot pour vérifier l'absence de recombinaison non homologue.

Dans ce but, 5 µg d'ADN des transformants et de la souche parentale sont digérés pendant une nuit avec une enzyme de restriction appropriée. Les fragments d'ADN sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% additionné de bromure d'éthidium (Biorad, Hercules, Californie). Le gel est ensuite incubé successivement dans des bains d'HCl 0,25 N (25 min sous agitation douce), de NaCl 1,5 M / NaOH 0,5 M (30 min), et de Tris salin (Tris-HCl 0,5 M pH 7,5 additionné de NaCl 1,5 M ; 20 min), avec rinçage en eau distillée après chaque bain.

Les fragments d'ADN sont ensuite transférés par capillarité sur membrane de nylon en tampon SSC 20X (Tri-sodium citrate, 88 g/L ; NaCl, 175 g/L) pendant une nuit. Après une nuit de transfert, le crosslinking est réalisé durant 3 min sous lumière UV, la membrane est ensuite rincée deux fois en tampon SSC 2X, puis incubée en présence d'une sonde appropriée marquée à la phosphatase alcaline (GE Healthcare life sciences, Chicago, Ill).

Les sondes utilisées ont été produites par PCR avec l'enzyme Gotaq comme décrit précédemment. Les amplicons sont précipités, puis purifiés sur gel. Après purification, la sonde (500 µg) est dénaturée (100°C, 5 min), puis refroidie sur de la glace durant 5 min, et enfin couplée à la phosphatase alcaline par incubation pendant 30 min à 37°C à l'aide du kit Alkphos Direct Labeling (GE Healthcare Life Sciences, Chicago, Ill).

La membrane est incubée avec une solution d'hybridation (GE Healthcare Life Sciences) préchauffée à

55°C sous agitation douce (60 rpm, 15 min). La sonde est ensuite déposée sur la membrane et le mélange réactionnel est incubé à 55°C pendant 12 à 16 h sous agitation douce (60 rpm). Une série de 4 lavages est réalisée, deux de 10 min à 55°C en tampon de lavage stringent (blocking reagent de GE Healthcare life sciences, 2 g/L additionné de $MgCl_2$ 1 mM, NaCl 8,7 g/L, phosphate de sodium 50 mM, SDS 1 g/L et urée 120 g/L) et deux autres de 5 min à température ambiante en tampon Tris-HCl 50 mM pH 7,5 addtionné de NaCl 0,1 M et $MgCl_2$ 2 mM. La sonde est ensuite révélée par addition du substrat de la phosphatase alcaline (CDP-star™ detection reagent 3 mL ; GE Healthcare Life Sciences). La sonde est visualisée par chémiluminescence (LAS4000 GE Healthcare).

Analyse phénotypique des mutants obtenus

Préparation des suspensions de spores

Les spores sont obtenues à partir des cultures sur milieu gélosé, par raclage en eau distillée stérile. Les filaments mycéliens sont éliminés par filtration sur membrane de nylon de 11 µM de porosité. Le filtrat est centrifugé (4600 rpm, 15 min, 4°C), et le culot est repris dans 1 mL d'eau distillée stérile pour dénombrement des spores en cellule de Malassez. Les analyses phénotypiques ont été réalisées sur les mutants validés par Southern blot, ainsi que sur la souche parentale *Ku70*Δ.

Cinétique de croissance en condition de stress oxydatif chimique

La croissance des mutants a été évaluée par LASER néphélométrie (Joubert *et al*. 2010). Dans ce but, des suspensions de spores (10^5 par mL) sont réalisées en milieu YPD. Trois cents microlitres de ces suspensions sont inoculés dans les puits de microplaque 96 puits (Greiner). Les cultures sont incubées durant 7 jours à 37°C dans un LASER néphélomètre (BMG Labtech, Ortenberg, Allemagne). 1000 cycles sont réalisés, composés de 300 s d'agitation à 200 rpm, suivi de 300 s sans agitation précédant chacune des mesures. Les expériences ont été réalisées en duplicat et trois réplicats expérimentaux sont effectués.

La croissance en présence de ménadione 25 µM (en solution dans du DMSO) a également été évaluée. Pour ces expériences, un contrôle en présence d'un volume équivalent de solvant a été réalisé.

Résistance à différents stress

La viabilité des spores des mutants et de la souche parentale a été analysée dans différentes conditions des stress. Dans ce but, des suspensions de spores (2×10^6 par mL) et des dilutions successives de 1/10 en 1/10 ont été ensemencées sous forme de gouttes de5 µL sur différents milieux de culture.

Nous avons ainsi étudié la croissance radiale à différentes températures (28, 37, et 42°C durant 3 jours) sur milieu YPDA et PDA.

De même nous avons évalué la croissance sur milieu YPDA additionné de calcofluor (à concentration allant de 10 à 320 µg/mL), de chlorure de sodium (de 62,5 µM à 1 mM), de ménadione (de 31,25 µM à 4 mM), de rouge congo (0,125 et 0,5 µg/mL), de SDS (de 10 à 320 µg/mL), ou de D-sorbitol (de 0,25 M à 2 M). Les cultures ont été incubées à 37°C durant 3 jours, puis à température ambiante pendant 4 jours. Toutes les expériences ont été réalisées en duplicat et trois réplicats expérimentaux sont effectués.

Microscopie électronique à transmission

Les spores des mutants et de la souche parentale ont été examinées en microscopie électronique à transmission après exposition durant 2 h à température ambiante à un stress oxydatif. Après incubation en présence de ménadione 0,11 mM ou 4 mM, les spores sont lavées, puis fixées dans un mélange formaldéhyde / glutaraldéhyde en tampon cacodylate de sodium 0,1 M. Après lavage en tampon cacodylate, les spores sont déshydratées dans des bains d'étahnol de concentration croissante, puis inclues en Epon (Ghamrawi *et al.* 2014). Les échantillons sont examinés sur microscope JEM-1400 (Jeol, Paris, France).

Analyse statistique

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Graphpad prism 6.0 (GraphPad, United States). Le test ANOVA a été utilisé pour comparer les données de LASER néphélométrie, ainsi que les paramètres morphologiques. Les résultats sont considérés comme significativement différents pour $p < 0,05$.

Résultats

Identification du gène codant le facteur de transcription Yap1

L'analyse du génome de *S. apiospermum* IHEM 14462 a révélé la présence d'un orthologue du gène *YAP1* d'*A. fumigatus*, le gène *CDS9352.* Ce gène présente une séquence codante de 1779 pb et la protéine déduite comporte 592 acides aminés. La protéine *Sa*Yap1 comprend un domaine *basic leucine zipper* (BLRZ) en position 158-223, un domaine correspondant au facteur de transcription Pap1 en position 251-569, et un domaine Yap1 redox en position 443-571.

Un orthologue de ce gène est retrouvé chez *S. apiospermum* HDO (Qc = 100% ; id = 99% ; en position 1545268 – 1547211 sur le scaffold 12), *S. boydii* IHEM 23826 (Qc = 100% ; id = 96% ; en position 136348 - 138291 sur le contig 26), et *S. aurantiacum* WM 09.24 (Qc = 100% ; id = 89% ; en position 690 – 2630 sur le scaffold 578). Les protéines déduites de ces gènes présentent de fortes homologies avec la séquence de SaYap1 **(Tableau IX)**. De plus les séquences protéiques correspondant aux facteurs de transcription Yap1 identifiés chez ces *Scedosporium* présentent une forte similarité avec celles déduites de gènes orthologues chez d'autres champignons, et notamment conservation du domaine bZIP, et des deux domaines riches en cystéine en position N- et C-terminale (cysteine rich domains n-CRD et c-CRD) **(Figure 23)** : *T. marneffei* (YpaA, XP_002145732.1 : Qc = 83% ; id = 36%), *S. cerevisiae* (Yap1, CAA41536.1 : Qc = 22% ; id = 49%), *S. pombe* (Pap1, CAA40363.1 : Qc = 27% ; id = 58%), *M. oryzae* (Moap1, XP_001408783.1 : Qc = 87% ; id = 50%), *A. fumigatus* (Afyap1, XM_745789.1 : Qc = 86% ; id = 35%), *A. alternata* (AaAP1, ACM50933 : Qc = 86% ; id = 36%), de *C. gloeosporioides* (CgAP1, XP_007275887.1 : Qc = 95%; id = 52%), et *U. maydis* (TPA, CAL48250 : Qc = 17%; id = 38%).

Tableau IX : Homologies entre les séquences protéiques déduites des orthologues de *Yap1* chez les *Scedosporium*

	Couverture (%)	Identité (%)	Structure protéique
S. apiospermum IHEM 14462			
S. apiospermum HDO	100	99	
S. boydii IHEM 23826	100	98	
S. aurantiacum WM 09.24	97	93	

Les pourcentages d'identité des séquences protéiques déduites pour les orthologues identifiés dans les trois autres génomes publiés pour le genre *Scedosporium* sont indiqués, ainis que les domaines fonctionnels. *BRLZ* : domaine basic leucine zipper; PAP1 : domaine correspondant au facteur de transcription Pap1.

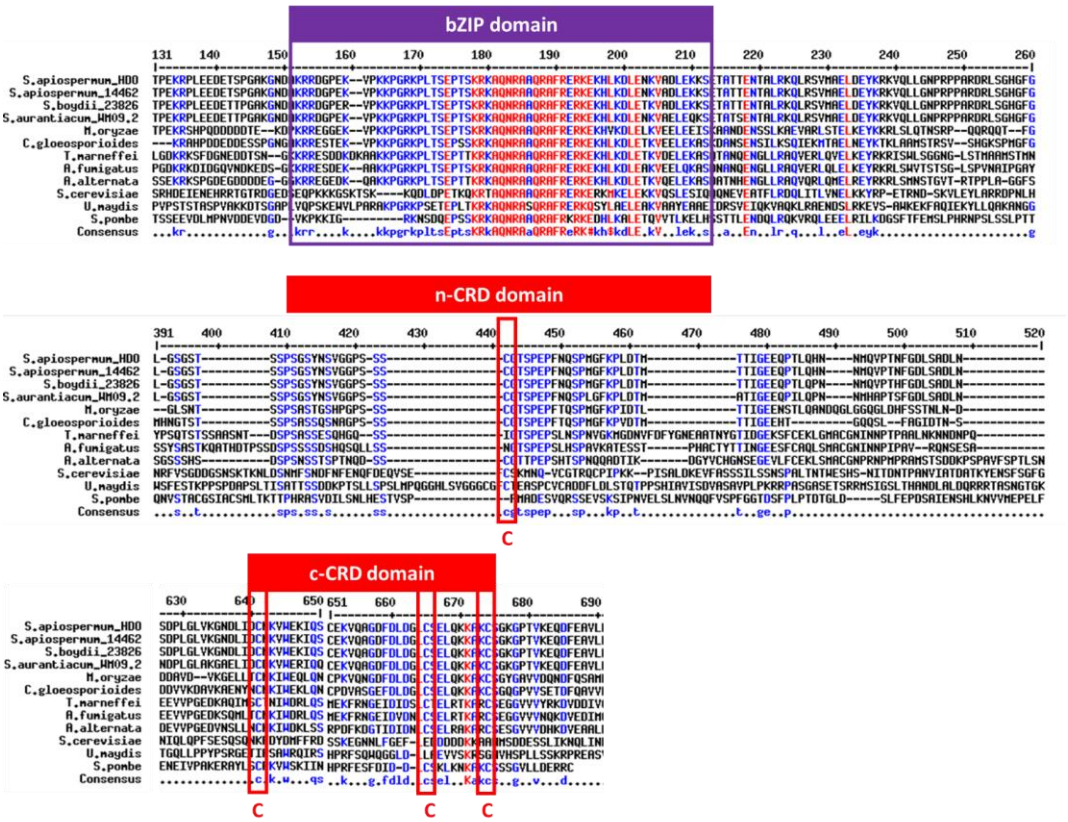


Figure 23 : Alignement des domaines protéiques bZIP, n-CRD et c-CRD des facteurs de transcription Yap1.

La séquence protéique déduite du gène *SaYAP1* de *S. apiospermum* IHEM 14462 (KEZ39486) est comparée aux séquences protéiques déduites de différents orthologues chez *S. apiospermum* HDO, *S. boydii* IHEM 23826, et *S. aurantiacum* WM 09.24, et d'autres champignons filamenteux ou levuriformes : *Magnaporthe oryzae* (XP_001408783.1), *Colletotrichum gloesporioides* (XP_007275887.1), *Talaromyces marneffei* (XP_002145732.1), *Aspergillus fumigatus* (XM_745789.1), *Alternaria alternata* (ACM50933), de *Saccharomyces cerevisiae* (CAA41536.1), *Ustilago maydis* (CAL48250), et de *Schizosaccharomyces pombe* (CAA40363.1).
bZIP : domaine basic leucine zipper ; *n-CRD* : domaine riche en cystéine en position N-terminale ; *c-CRD* : domaine riche en cystéine en position C-terminale.

Production des cassettes de délétion par clonage bactérien

Afin de préciser le rôle de ce régulateur transcriptionnel et de certains gènes surexprimés en réponse à un stress oxydant, nous avons tenté de préparer des souches mutantes. Outre le gène *SaYAP1* (*CDS9352*), nous avons retenu parmi les gènes surexprimés en réponse à un stress oxydant, six gènes des systèmes du glutathion (*CDS6039*, *CDS0416*, *CDS8864*) ou de la thiorédoxine (*CDS10274*, *CDS1830*, *CDS9937*), ainsi que le gène codant la Cu/ZnSOD à ancre GPI (*CDS3212*) compte tenu de son expression spécifique en surface des spores, qui constituent très probablement la forme de contamination des patients. Les régions 5'UTR et 3'UTR de chacun des gènes ciblés ont été amplifiées par PCR. L'analyse électrophorétique des amplifiats a confirmé l'efficacité de nos PCR, montrant l'obtention de fragments d'ADN de la taille attendue **(Figure 24, Tableau VII).**

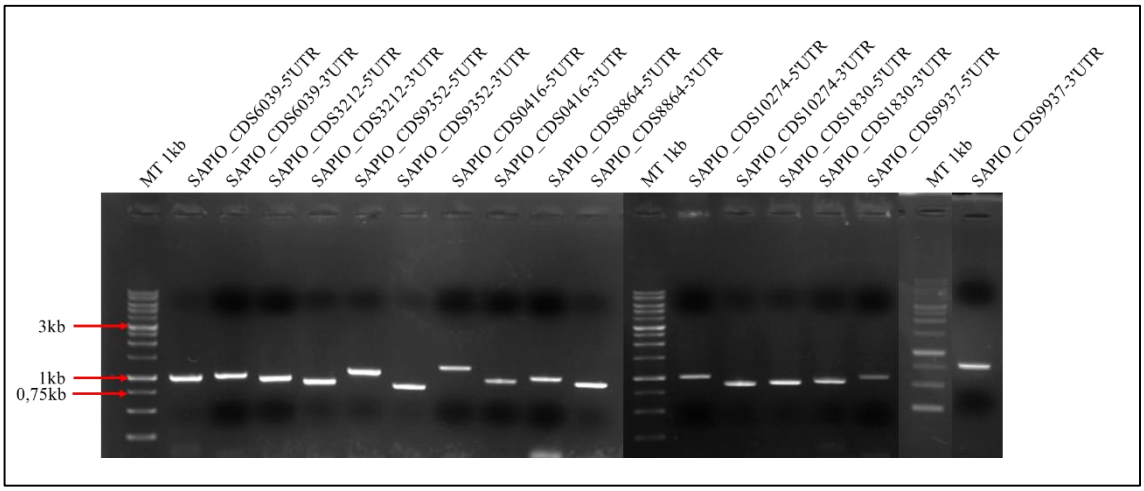


Figure 24: Analyse électrophorétique des produits d'amplification des extrémités 5'UTR et 3'UTR

Analyse des produits de PCR correspondant aux extrémités 5'UTR et 3'UTR des gènes cibles. La taille attendue pour les différents produits de PCR fragments figure dans le tableau III. 5'UTR : séquence nucléotidique d'environ 1 kb située en amont du gène cible ; 3'UTR : séquence nucléotidique d'environ 1 kb située en aval du gène cible ; MT 1kb : marqueur de taille de 1 kb, *CDS0416* : gène codant une glutarédoxine *; CDS1830* : gène codant une thiorédoxine réductase ; *CDS3212* : gène codant une Cu/Zn-SOD ; *CDS6039* : gène codant une glutathion réductase ; *CDS8864* : gène codant une glutathion peroxydase ; *CDS9352* : gène codant le facteur de transcription *SaYAP1*; *CDS9937* : gène codant une peroxyrédoxine ; *CDS_10274* : gène codant une thiorédoxine réductase.

Ces produits de PCR ont été digérés avec les enzymes adéquates pour l'insertion dans le plasmide pAN7.1. Malgrè de nombreux essais et différentes adaptations des protocoles, nous n'avons pas réussi à insérer les produits d'amplification dans les plasmides. Nous nous sommes donc tournés vers une autre stratégie, la PCR fusion, pour produire les cassettes, et nous avons choisi de nous limiter aux gènes *CDS1830, CDS10274, CDS3212* et *CDS9352* codant respectivement les deux thiorédoxine réductases, une Cu/Zn-SOD à ancre GPI, et le facteur de transcription *Sa*Yap.

Production des cassettes de délétion par PCR fusion

Dans cette approche, les extrémités 5'UTR et 3'UTR correspondant aux gènes à déléter ont été obtenues par PCR ainsi que le gène *HPH* avec les extrémités chevauchantes propres à chacun des gènes. Après purification sur gel, les cassettes de délétion ont été obtenues par ligature des produits d'amplification par PCR en présence des amorces P7 et P8. L'électrophorèse confirme l'obtention d'amplicons de taille conforme à celle attendue (**Figure 25, Tableau VIII**).

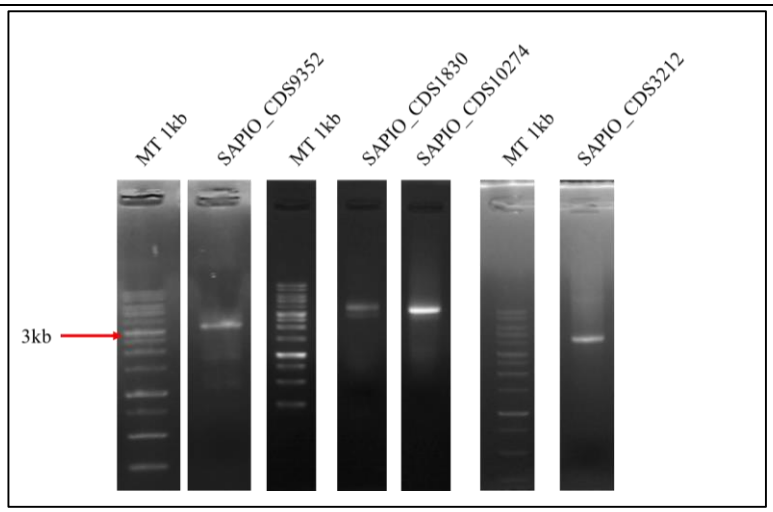


Figure 25: Analyse électrophorétique des produits de PCR fusion.

La taille attendue des produits de PCR fusion figure dans le tableau 2. MT 1kb, marqueur de taille de 1 kb ; *CDS1830* : gène codant une thiorédoxine réductase ; *CDS3212* : gène codant la Cu/Zn-SOD à ancre GPI ; *CDS9352* : gène codant le facteur de transcription *SaYAP1; CDS10274* : gène codant la seconde thiorédoxine réductase.

Tentatives de transformation

A partir des cassettes obtenues pour les gènes *CDS1830* et *CDS10274,* deux essais de transformation de la souche *S. apiospermum* IHEM 14462:*Ku*70Δ ont été effectués, qui se sont avérés infructueux. Aucun transformant n'a été obtenu.

Par contre, trois transformants ont été obtenus avec la cassette préparée pour le gène *CDS9352* : *Sa*Yap1-A1, *Sa*Yap1-A2, *Sa*Yap1-A3 **(Figure 26)**. Après clonage par dilution limite, l'ADN génomique a été extrait à partir des clones obtenus, puis analysé par Southern blot. Dans ce but, les ADN ont été digérés par l'enzyme *Mlu*I et une sonde correspondant à l'extrémité 3'UTR a été produite par PCR. Cette sonde permet la détection d'un fragment de 8808 pb pour la souche parentale, et d'un fragment de 5017 pb pour la souche mutée ayant intégré la cassette au locus ciblé. L'analyse par Southern blot a montré que les clones *Sa*Yap1-A1 et *Sa*Yap1-A3 n'avaient pas intégré la cassette au locus ciblé, puisqu'un seul fragment d'environ 8800 pb est révélé **(Figure 27)**. Par contre, pour les différents clones *Sa*Yap1-A2, deux fragments sont révélés, l'un d'environ 5000 pb correspondant à la taile attendu en cas de recombinaison homologue, associé à une bande d'environ à 8800 pb correspondant au gène sauvage. Les clones *Sa*Yap1-A2 présentent à la fois le gène sauvage et la cassette de résistance, signe d'une insertion aléatoire. Aucune analyse phénotypique n'a donc été réalisée sur ces mutants.

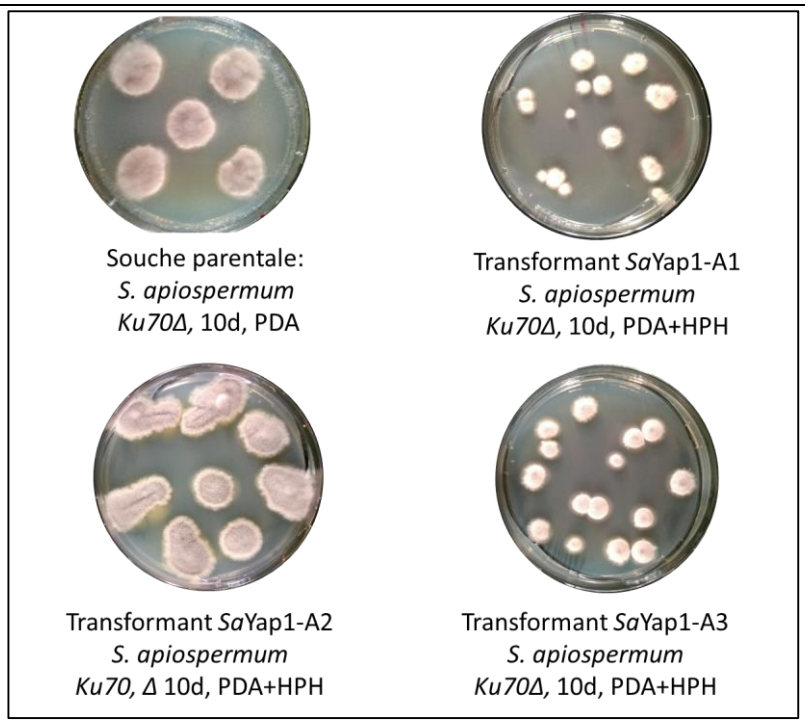


Figure 26 : Colonies des transformants obtenus pour le gène *CDS9352* codant le facteur de transcription SaYap1.

Aspect macroscopique des clones obtenus pour le gène *CDS9352* codant le facteur de transcription *SaYap1* et de la souche parentale après 10 jours de culture sur milieu PDA additionné ou non d'hygromycine (HPH).

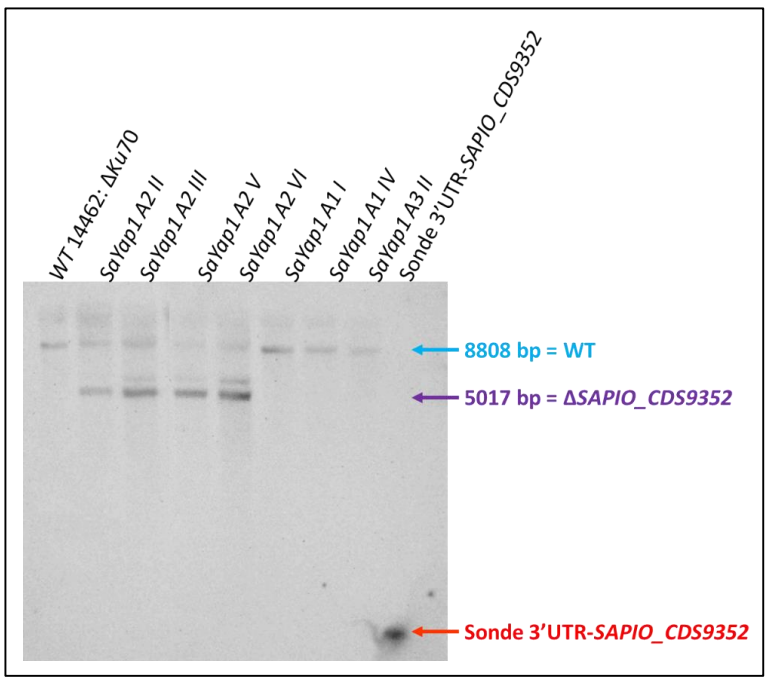


Figure 27 : Analyse par Southern blot des clones obtenus après transformation de la souche IHEM 14462:*Ku70*Δ avec la cassette de délétion du gène *CDS9352*.

Analyse par Southern blot après digestion des ADN génomiques par *Mlu*I et hybridation avec la sonde. La sonde s'hybride sur la souche parentale, et permet la détection d'un fragment de 8,8 kb, alors que sur la souche mutée un fragment d'une taille de 5 kb est attendu en cas de recombinaison homologue. Pour les différents clones SaYap1 A1 et SaYap1 A3, une seule bande de 8,8 kb est observée comme pour la souche parentale. Pour les clones correspondant aux transformants SaYap1 A2, deux bandes de 8,8 kb et 5 kb sont observées.

Enfin, quatre transformants ont été obtenus avec la cassette obtenue pour le gène *CDS3212* **(Figure 28)**. Des clones issus de monospores ont été produits pour chacun des transformants, leur ADN a été extrait et analysé par Southern blot après digestion par l'enzyme *Xba*I, avec révélation par une sonde appropriée correspondant à l'extrémité 5'UTR du gène cible. Cette sonde permet la détection d'un fragment de 5524 pb pour la souche parentale, et de 3027 pb pour la souche mutée en cas de recombinaison homologue **(Figure 29)**. L'analyse par Southern blot montre que les transformants *Sa*SOD3212-A2, *Sa*SOD3212-A3, et *Sa*SOD3212-A4 n'ont pas intégré la cassette de délétion (une seule bande d'environ 5500 pb). Par contre, un seul fragment d'environ 3000 pb correspondant à la cassette de délétion est révélé par la sonde pour les différents clones *Sa*SOD3212-A1, confirmant la recombinaison homologue et la délétion du gène *CDS3212* codant la Cu/Zn-SOD à ancre GPI **(Figure 30)**.

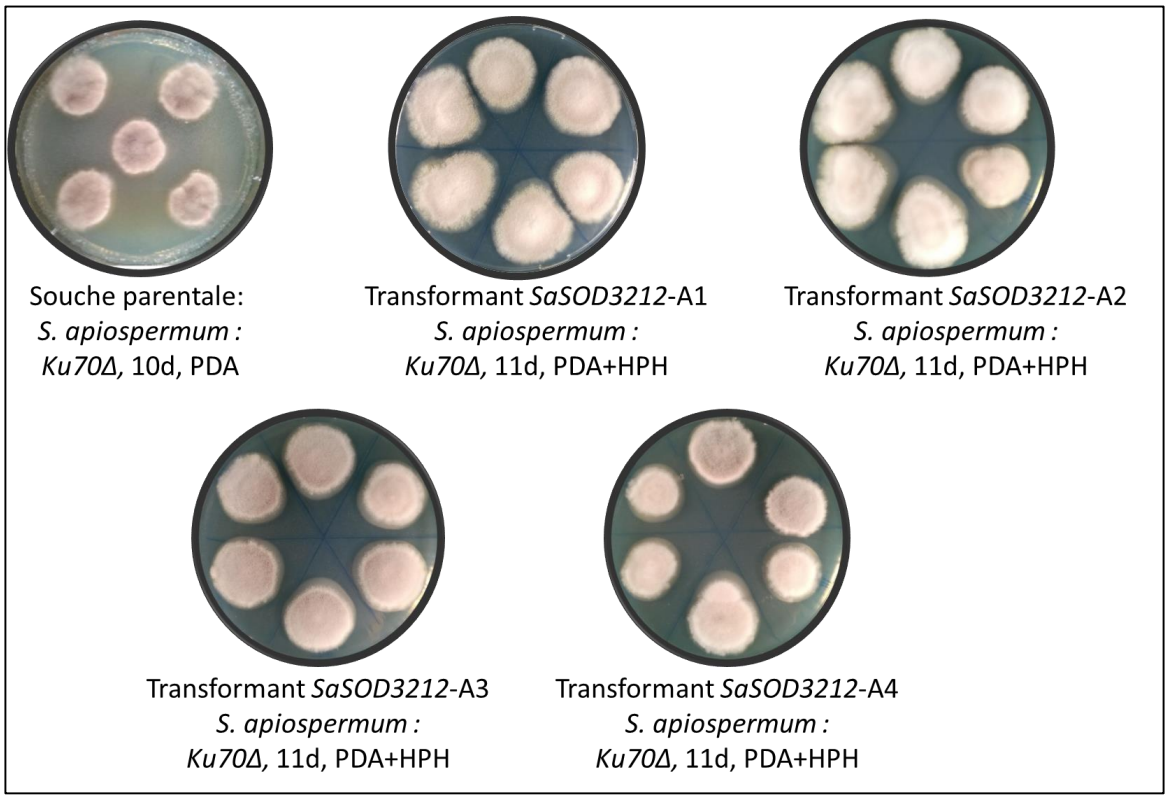


Figure 28: Colonies des transformants obtenus pour le gène *CDS3212* codant la Cu/Zn-SOD à ancre GPI.

Aspect macroscopique des transformants et de la souche parentale après 11 jours de culture sur milieu PDA additionné ou non d'hygromycine (HPH).

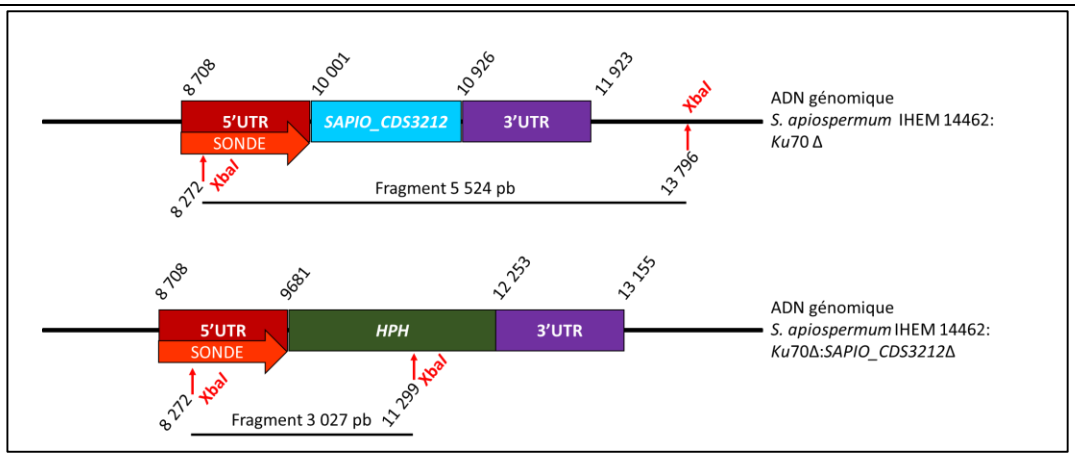


Figure 29: Taille des fragments attendus pour la souche parentale et le mutant pour le gène *CDS3212.*

Taille des fragments attendus après digestion de l'ADN génomique de la souche parentale et des mutants pour le gène *CDS3212* par *XBa*I et hybridation avec la sonde. La sonde est produite par amplification de la région 5'UTR avec les amorces P1/P2. Sur la souche parentale, elle permet la détection d'un fragment de 5,5 kb, alors qu'un fragment de 3 kb est attendu pour la souche mutée. 5'UTR : séquence nucléotidique d'environ 1 kb située en amont du gène cible ; 3'UTR : séquence nucléotidique d'environ 1 kb située en aval du gène cible ; *HPH* : gène de résistance à l'hygromycine ; *CDS3212* : gène codant la Cu/Zn-SOD à ancre GPI.

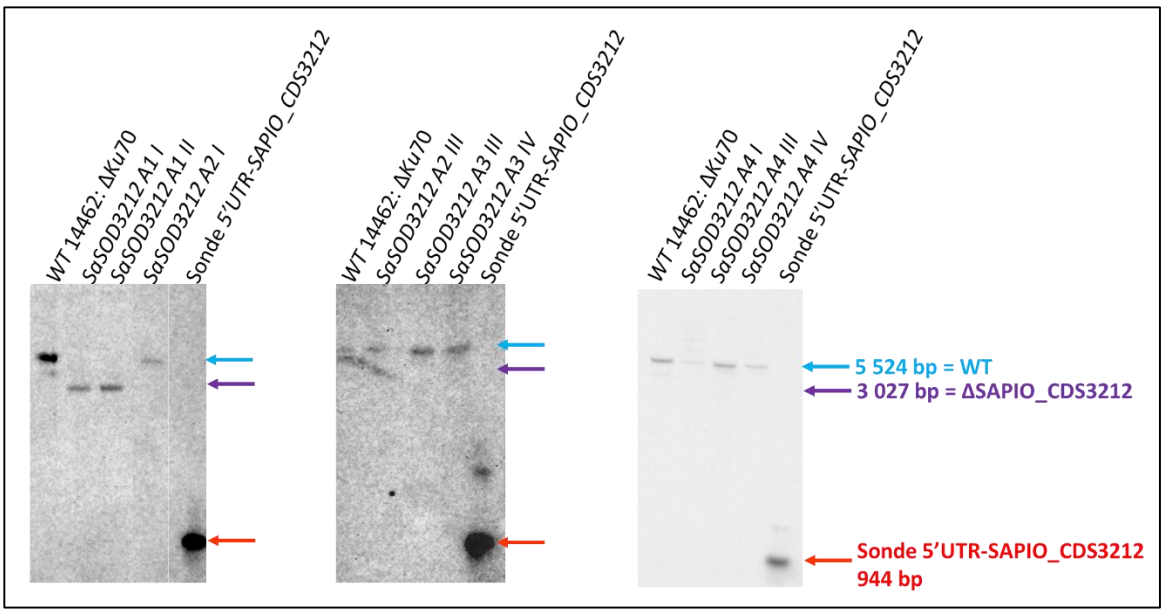


Figure 30 : Analyse par Southern blot des transformants SaSOD3212 A1, A2, A3, A4 obtenus après transformation pour le gène *CDS3212*.

Analyse par Southern blot après digestion par *Xba*I des ADN génomiques et hybridation avec la sonde. La sonde s'hybride sur la souche parentale, et permet la détection d'un fragment de 5,5 kb, alors qu'un fragment de 3 kb est attendu pour la souche mutée. Pour les différents clones SaSOD3212 A2, A3, et A4, une bande de 5,5 kb est observée, comme pour la souche parentale. Par contre, seule une bande de 3 kb est observée pour les clones SaSOD3212 A1, traduisant l'insertion de la cassette au locus ciblé.

Etude phénotypique du mutant défectif pour le gène *CDS3212*

Les clones SaSOD3212 A1 obtenus pour le gène *CDS3212* ont été comparés à la souche parentale IHEM 14462:*Ku*70Δ. La croissance a été évaluée à différentes températures. Ni les mutants, ni la souche parentale ne sont capables de croître à 42°C. La croissance est plus importante à 37°C qu'à 28°C, et dans les deux cas un peu plus faibles pour les mutants que pour la souche parentale **(Figure 31)**.

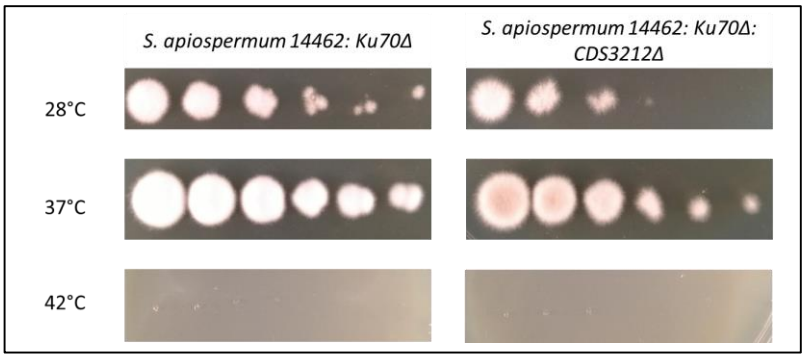


Figure 31: Croissance de la souche parentale et des mutants sur milieu PDA après 3 jours d'incubation à différentes températures.

Aucune différence de croissance n'est observée entre le mutant *Sa*ΔSOD3212 et la souche parentale en présence d'agents osmotiques (NaCl et sorbitol) comme en présence de SDS ou de Calcofluor. Par contre en présence de rouge Congo, la souche mutante présente une croissance moindre comparativement à la souche parentale **(Figure 32)**.

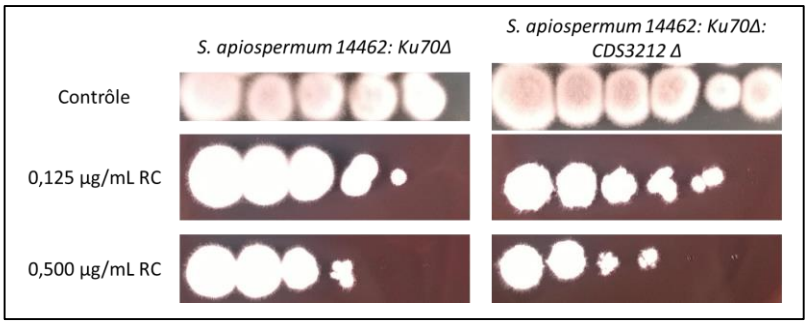


Figure 32: Croissance en présence de rouge Congo (3 jours d'incubation)

La cinétique de croissance a également été étudiée par LASER néphélométrie en milieu YPD. La délétion du gène *CDS3212* entraîne une augmentation du temps de latence (p : 0,0095). La phase stationnaire se situe à un niveau similaire pour la souche mutée et la souche parentale. Curieusement, alors que ce niveau de croissance est maintenu pendant toute la durée de l'expérience pour la souche mutée, une phase de dégénérescence est observée pour la souche parentale IHEM 14462: *Ku*70Δ à partir de 80 h **(Figure 33)**.

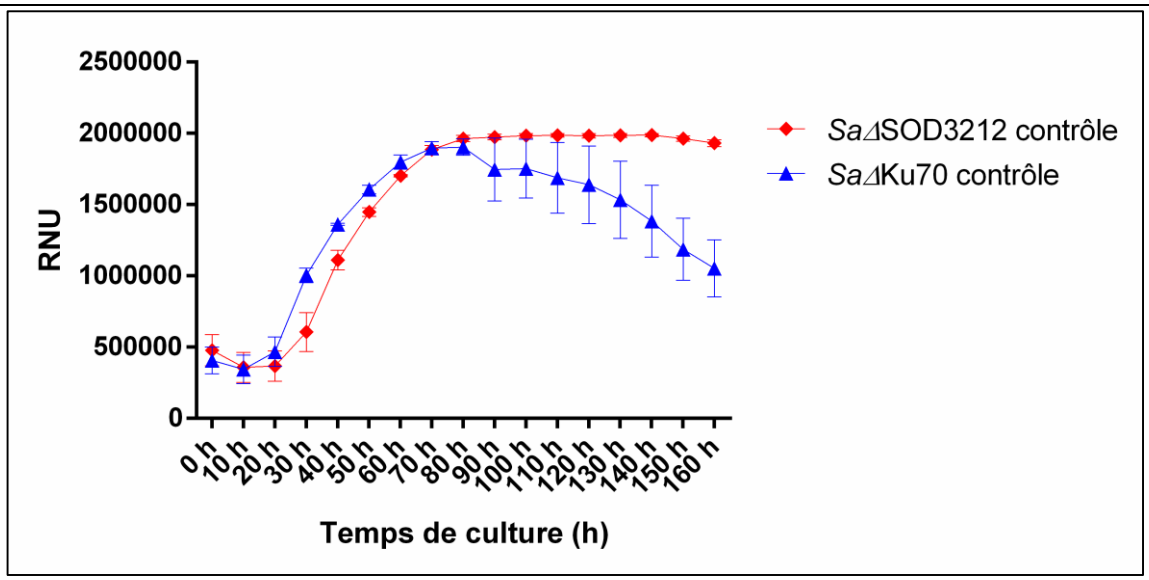


Figure 33: Cinétique de croissance du mutant *SaΔSOD3212* et de la souche parentale évaluée par LASER néphélométrie.

RNU : unité de mesure relative.

L'exposition des spores à la ménadione 25 µM se traduit par un décalage de la courbe de croissance pour la souche mutée comme pour la souche parentale comparé au contrôle (incubation en présence d'un volume équivalent de DMSO, solvant de la ménadione). Le temps de latence est significativement plus important pour le mutant comparé à la souche parentale IHEM 14462:*Ku*70Δ **(Figure 34)** (p : 0,0022). La germination est peu affectée par la présence de DMSO pour les deux souches. Par contre, le temps de latence est de 39 ± 4 h pour la souche parentale alors que la levée de l'inhibition de croissance ne s'effectue qu'après 67 ± 4 h d'incubation pour la souche mutée.

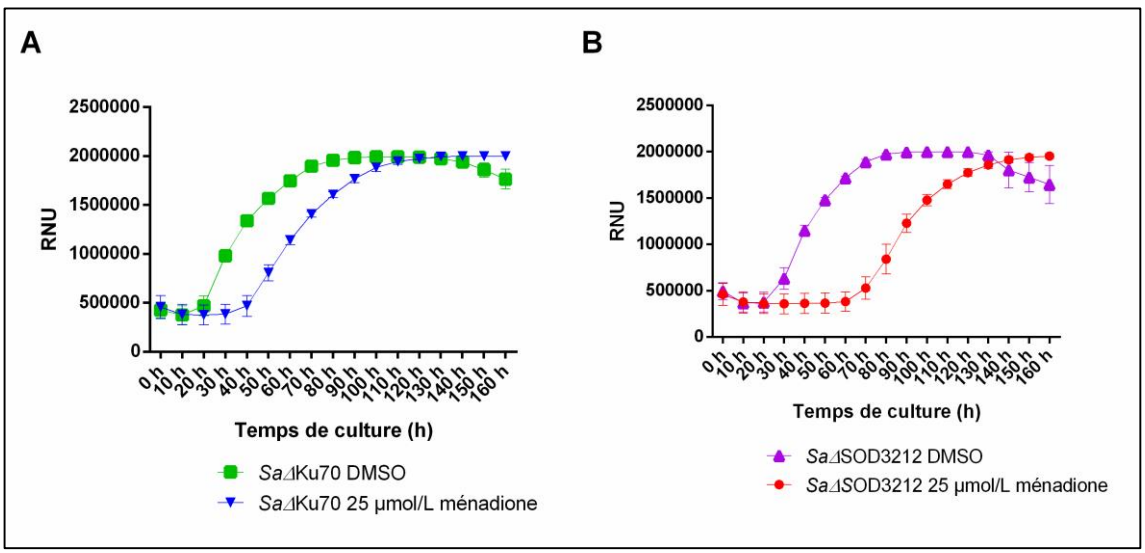


Figure 34: Cinétique de croissance de la souche parentale (A) et du mutant Sa*ΔSOD3212* (B) en présence de ménadione 25 µM.

RNU : unité de mesure relative.

Les spores ont été examinées après exposition ou non à un stress oxydatif induit par la ménadione et les paramètres morphologiques, à savoir la longueur et la largeur des spores dormantes, ainsi que l'épaisseur de leur paroi, ont été mesurés **(Figure 35 et 36)** Aucune différence n'est observée en terme de longueur et largeur des spores. Les dimensions moyennes des spores de la souche parentale sont de 6,374 ± 0,248 µm x 3,903 ± 0,106 µm contre 6,376 ± 0,179 µm x 3,834 ± 0,144 µm pour le mutant. Par contre, l'épaisseur de la paroi sporale est significativement plus importante pour le mutant avec une épaisseur moyenne de 436,1 ± 28,63 nm contre 294,5 ± 16,98 nm pour la souche parentale (*p* : 0,0002). L'exposition des spores pendant 2 h à un stress oxydatif induit par la ménadione n'affecte pas ces paramètres (données non montrées).

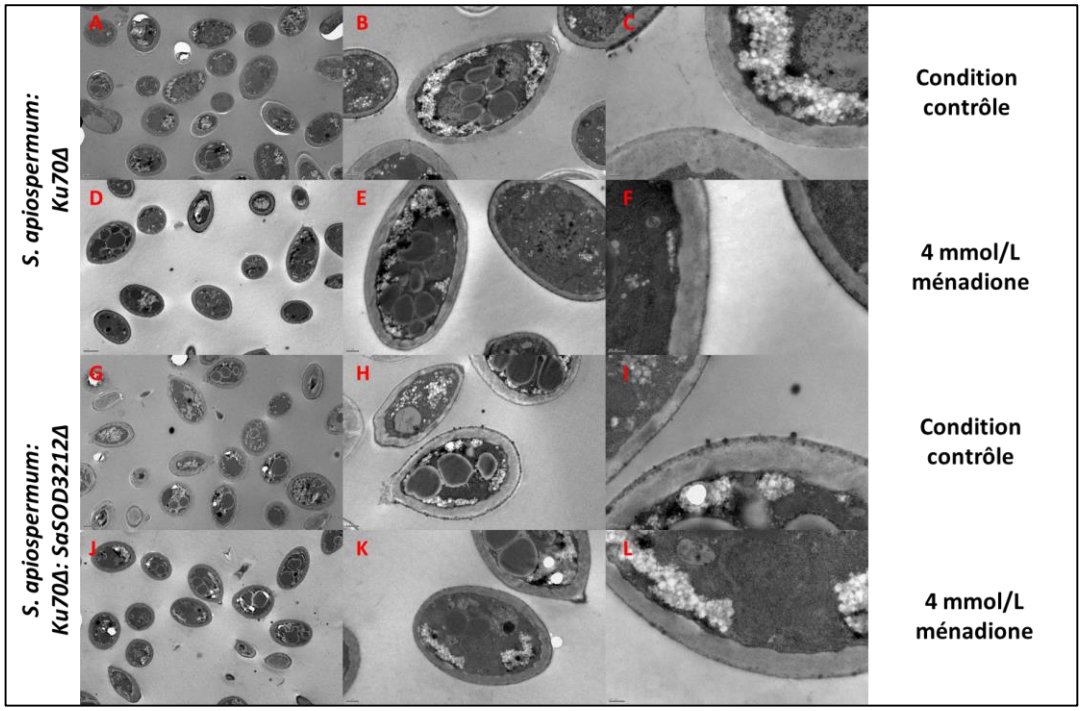


Figure 35: Aspect des spores de la souche parentale (A-F) et du mutant SaΔSOD3212 (G-L) en microscopie électronique à transmission.

Les spores dormantes de la souche parentale et du mutant *SaΔSOD3212* sont fixées pour examen en microscopie électronique à transmission sans exposition préalable à un stress oxydatif (A, B, C, G, H et I) ou après exposition à la ménadione 4 mM (D, E, F, J, K et L). Les barres correspondent à 2 µm en A, D, G et J, à 500 nm en B, E, H, et K ; à 200 nm en C, F, I et L.

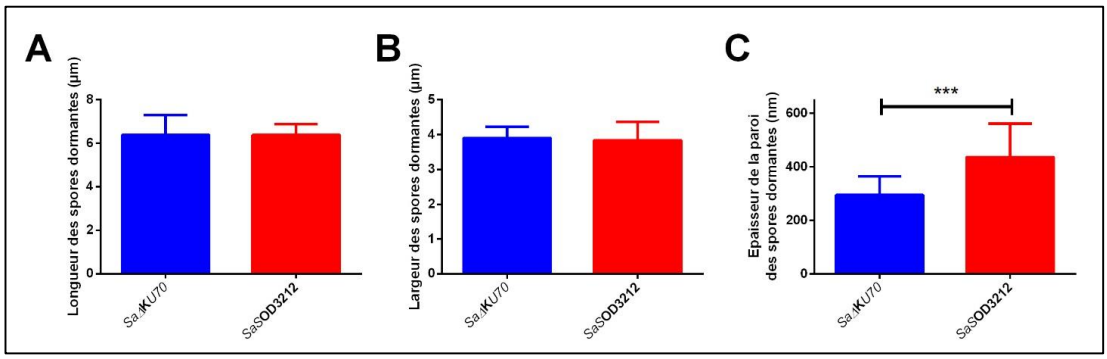


Figure 36: Dimensions (longueur A, largeur B) et épaisseur de la paroi (C) des spores dormantes de la souche parentale (*SaKu70Δ*) et du mutant (*SaΔSOD3212*).

Alors qu'aucune différence n'est observée sur les dimensions des spores entre le mutant et la souche parentale, l'analyse statistique par le test ANOVA indique une différence significative dans l'épaisseur de la paroi entre le mutant et la souche parentale (****p* = 0,0002).

Discussion

L'objectif de cette étude était de produire des mutant défectifs pour certains gènes de *S. apiospermum* potentiellement impliqués dans la réponse au stress oxydatif. Nous avons ainsi identifié dans le génome un homologue de YAP1 d'*Aspergillus fumigatus* et sélectionné 8 gènes parmi les gènes surexprimés en réponse au stress oxydatif dans nos expériences précédentes. Aucun protocole n'étant à l'époque disponible pour la transformation chez *S. apiospermum*, différentes approches ont été envisagées, avec dans un premier temps la construction de cassettes de délétion par clonage dans le plasmide pAN7.1 Ces essais se sont malheureusement avérés infructueux. Une autre stratégie, la PCR fusion, a dont été utilisée et nous nous sommes alors focalisés sur les gènes codant les deux thiorédoxine réductases et la Cu/Zn-SOD à ancre GPI, ainsi que sur le gène codant le facteur de transcription *Sa*YAP1.

L'étude de la réponse trancriptionnelle du champignon à différents stress oxydatifs a suggéré un rôle central du système de la thiorédoxine, et en particulier de la thiorédoxine réductase codée par le gène *CDS1830*. Les thiorédoxine réductases ont été décrites comme impliquées dans la réponse au stress oxydatif chez de nombreux champignons filamenteux ou levuriformes comme *A. fumigatus* (Sugui *et al.* 2008), *B. bassiana* (Zhang *et al.* 2016), *B. cinerea* (Viefhues *et al.* 2014), *Candida albicans* (Kusch *et al.* 2007), *C. neoformans* (Missall et Lodge 2005), *M. oryzae* (Fernandez et Wilson 2014), *S. cerevisiae* (Machado *et al.* 1997; Pedrajas *et al.* 1999), et *S. pombe* (Park *et al.* 2012). Ces enzymes pourraient donc jouer un rôle important dans la virulence de *S. apiospermum* comme rapporté pour *B. cinerea* (Viefhues *et al.* 2014).

Malheureusement, nous n'avons pu obtenir de transformants pour ces gènes. Chez *Cr. neoformans,* le gène *TRR1* est essentiel à la viabilité (Missall et Lodge 2005), comme chez *P. falciparum* (Krnajski *et al.* 2002) et *Staphylococcus aureus* (Uziel *et al.* 2004). Les thiorédoxine réductases pourraient donc être essentielles à la viabilité de *S. apiospermum.* Néanmoins, des mutants pour des gènes de thiorédoxine réductases ont été obtenus pour certaines espèces fongiques, notamment *B. bassiana* (Zhang *et al.* 2016), *B. cinerea* (Viefhues *et al.* 2014), *S. cerevisiae* (Machado *et al.* 1997; Pedrajas *et al.* 1999) et *S. pombe* (Park *et al.* 2012).

Il est donc impératif d'envisager d'autres approches pour obtenir des mutants pour les gènes des thiorédoxine réductases chez *S. apiospermum* pour conclure sur le caractère essentiel de ces enzymes et leur rôle dans la virulence. Une autre stratégie serait de muter la région codant le site actif de l'enzyme ou le promoteur de ces gènes comme cela a été réalisé chez *Cr. neoformans* (Missall et Lodge 2005). Le remplacement du promoteur par un promoteur faible ou inductible permettrait d'évaluer l'importance de ces gènes chez *S. apiospermum.* Une autre stratégie serait d'utiliser des inhibiteurs des thiorédoxine réductases (envisagée dans le chapitre suivant).

Les orthogues du facteur de transcription Yap1 de *S. cerevisiae* ont été identifiés chez de nombreux champignons comme participant la réponse au stress oxydatif **(Tableau VI)**. Ils sont notamment capables de réguler l'expression des superoxyde dismutases, des catalases, des glutathion peroxydases, des glutathion réductases, des alkyl hydroxyde réductases, des peroxyrédoxines, des thiorédoxines, ou encore des cytochrome C peroxydases (Lee *et al.* 1999; Gasch *et al.* 2000; Dumond *et al.* 2000; Temme et Tudzynski 2009; Reverberi *et al.* 2012; Montibus *et al.* 2013; Dankai *et al.* 2016; Sun *et al.* 2016; Chen *et al.* 2017). Ils sont aussi impliqués dans la régulation des gènes impliqués dans la biosynthèse des antioxydants non enzymatiques comme l'acide ascorbique, le glutathion, ou encore de gènes intervenant dans la régénération des antioxydants. Ainsi ils

particieraient à la résistance contre les macrophages chez certains pathogènes humains comme *Talaromyces marneffei* (Dankai *et al.* 2016).

Ces facteurs de transcription joueraient également un rôle clé dans la physiologie des champignons filamenteux. Chez *Alternaria alternata, Aspergillus parasiticus, Fusarium graminearum, M. oryzae,* et *T. marneffei,* ils contrôlent la croissance radiale (Yang *et al.* 2009; Guo *et al.* 2011; Chung 2012; Reverberi *et al.* 2012; Montibus *et al.* 2013; Dankai *et al.* 2016). De même, la délétion de ces gènes chez *A. parasiticus, F. graminearum, M. oryzae* et *T. marneffei* se traduit par un défaut de conidiogénèse (Guo *et al.* 2011; Reverberi *et al.* 2012; Montibus *et al.* 2013; Dankai *et al.* 2016). Ils interviendraient également pour certaines espèces fongiques dans la synthèse ou l'organisation des composants de la paroi. La délétion de ces gènes n'affecte cependant pas la sensibilité au stress osmotique chez *A. alternata* (Lin *et al.* 2009), *A. fumigatus* (Qiao *et al.* 2008), *Aspergillus nidulans* (Asano *et al.* 2007), *B. cinerea* (Temme et Tudzynski 2009) et *C. gloeosporoides* (Sun *et al.* 2016), contrairement à ce rapporté pour *F. graminearum* (Montibus *et al.* 2013). Une seule étude s'est intéressée aux conséquences de la délétion de ce gène sur la sensibilité au rouge congo : chez *C. gloeosporoides,* la délétion de ce gène n'affecte pas la sensibilité (Sun *et al.* 2016). Enfin, Yap1 a été identifié comme participant à la réponse aux antifongiques chez *A. fumigatus, C. albicans, Cr. neoformans, S. cerevisiae* et *S. pombe* (Toone *et al.* 1998; Alarco et Raymond 1999; Qiao *et al.* 2010; Paul *et al.* 2015). Les homologues de Yap1 identifiés chez les *Scedosporium* pourraient eux aussi participer à la régulation des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques de détoxification des ROS, mais aussi à la résistance vis-à-vis des antifongiques.

Le rôle de ces facteurs de transcription dans la virulence n'est cependant pas clair, compte tenu des résultats souvent contradictoires qui ont été publiés (**Tableau 1**). Ils sont impliqués dans la virulence pour *A. alternata* et *B. cinerea* (Yang *et al.* 2009 ; Temme et Tudzynski 2009 ; Lin *et al.* 2009, 2011), contrairement à ce décrit pour d'autres phytopathogènes, notamment *Fusarium graminearum* et *Monilinia fructicola* (Montibus *et al.* 2013; Yu *et al.* 2017). Chez certains microorganismes, il a été démontré que la pathogénicité des mutants Yap1 était restauré en présence d'inhibiteur de la NADPH oxydase (Molina et Kahmann 2007; Yang *et al.* 2009; Chung 2012).

De plus amples études sont nécessaires pour conclure sur le rôle de ces gènes chez les *Scedosporium*. En effet, si nos essais de transformation ont bien permis l'intégration de la cassette, le mutant obtenu présentait en fait et le gène de résistance à l'hygromycine et le gène sauvage codant la protéine *Sa*Yap1, signe d'une insertion ectopique de la cassette de délétion dans le génome de la souche IHEM 14462*:Ku70Δ.* Compte tenu de l'absence de mutants au locus ciblé, il est possible que ce gène soit essentiel à la viabilité de *S. apiospermum*. Néanmoins, des mutants sur ce gène ont été décrits pour un grand nombre de levures et champignons filamenteux. De nouvelles stratégies doivent être envisagées. En effet, si la PCR fusion nous a bien permis de produire la cassette de délétion, les quantités obtenues sont très faibles, limitant ainsi le nombre de tentatives de transformation. Il importe donc de développer une méthode permettant d'obtenir une quantité plus importante de cassettes de déletion et une approche possible serait de produire les cassettes et de les cloner dans un plasmide, comme pGEMT. Il est aussi nécessaire d'améliorer les conditions de production des protoplastes. Le nombre de tubes germinatifs et donc de protoplastes obtenus dans nos conditions expérimentales reste faible. Il est envisagé d'augmenter la durée d'incubation initiale et de travailler sur des tubes germinatifs de 36 h ou de les produire sous atmosphère enrichie en 5% de dioxyde de carbone ce qui stimule la germination (Mello *et al.* 2016).

Le rôle des SODs dans la réponse au stress oxydatif chez les champignons pathogènes est aujourd'hui largement documenté (Desai *et al.* 1995; Hamilton *et al.* 1996; Hwang *et al.* 1999, 2002; Narasipura *et al.* 2003; Martchenko *et al.* 2004; Rolke *et al.* 2004; Park *et al.* 2005; Fradin *et al.* 2005; Thirach *et al.* 2007; Frohner *et al.* 2009; Lambou *et al.* 2010; Miramón *et al.* 2012; Youseff *et al.* 2012; Gleason *et al.* 2014; Garfoot et Rappleye 2016; Tamayo *et al.* 2016; López-Cruz *et al.* 2017). Des mutants ont été obtenus pour différentes Cu/Zn-SOD chez *A. fumigatus* (Lambou *et al.* 2010), *B. cinerea* (Rolke *et al.* 2004; López-Cruz *et al.* 2017), *C. albicans* (Hwang *et al.* 2002; Miramón *et al.* 2012), *Cr. neoformans* (Narasipura *et al.* 2003), *Histoplasma capsulatum* (Youseff *et al.* 2012; Garfoot et Rappleye 2016), *Paracoccidioides brasiliensis* (Tamayo *et al.* 2016), et très récemment pour *S. aurantiacum* (Pateau *et al.* 2017). Ici nous avons produit pour *S. apiospermum* un mutant pour le gène *CDS3212* codant une Cu/Zn-SOD pourvue d'une ancre GPI. Ce mutant présente lui aussi une sensibilité accrue au stress oxydatif induit chimiquement, et notamment aux anions superoxydes. Des mutants pour des gènes codant des SODs à ancre GPI ont été produits pour différents champignons d'importance clinique comme *C. albicans* (Sod4, Sod5, Sod6) (Martchenko *et al.* 2004; Fradin *et al.* 2005; Miramón *et al.* 2012; Dantas *et al.* 2015), *H. capsulatum* (Sod3) (Youseff *et al.* 2012) et *P. brasiliensis* (Sod3) (Tamayo *et al.* 2016).

Ce gène n'est pas essentiel à la croissance chez *S. apiospermum*. Néanmoins, le mutant présente un retard de croissance comparé à la souche parentale et une sensibilité accrue au rouge congo. Par ailleurs, l'examen des spores dormantes a révélé des altérations ultrastructurales de la paroi, avec un épaississement marqué de la paroi. De plus amples investigations devront être conduites sur ce mutant.

Cette enzyme, exprimée à la surface de la paroi fongique, et localisée spécifiquement sur la paroi sporale, pourrait en effet jouer un rôle très important dans l'échappement des spores inhalées aux défenses immunitaires de l'hôte, et donc dans les phases initiales de la colonisation des voies respiratoires. Plusieurs exemples du rôle des Cu/Zn-SODs, y compris de protéines à ancre GPI, dans la virulence des champignons pathogènes sont déjà disponibles. Ainsi la délétion du gène *SOD5* de *C. albicans* s'accompagne d'une réduction de la virulence (Martchenko *et al.* 2004) ; de même, l'invalidation du gène *SOD3* de *P. brasiliensis* se traduit par une virulence atténuée, contrairement à l'invalidation du gène *SOD1* codant une protéine cystosolique chez ce même pathogène (Tamayo *et al.* 2016). Le rôle du gène *CDS3212* dans la protection des spores de *S. apiospermum* vis-à-vis des défenses immunitaires de l'hôte devra être confirmé par des expériences de co-cultures avec des cellules phagocytaires avec évaluation du killing et par l'étude de la virulence dans un modèle expérimental sur animaux non immunodéprimés.

De plus il a été démontré que les SODs de *C. albicans* était impliquée dans la résistance à certains antibiotiques comme l'amphotéricine B et le miconazole (Sokol-Anderson *et al.* 1986; González-Párraga *et al.* 2011; Bink *et al.* 2011; De Brucker *et al.* 2013; De Cremer *et al.* 2016). L'utilisation d'inhibiteurs enzymatiques des SODs entraînent d'ailleurs une perte de la résistance (Bink *et al.* 2011; De Brucker *et al.* 2013). La sensibilité des spores du mutant *Sa*Δ*SOD3212* aux antifongiques devra donc être évaluée.

En conclusion, parmi les différentes approches que nous avons développées pour générer des mutants défectifs, seule la PCR fusion s'est révélée efficace, nous permettant sur une souche invalidée pour le gène *Ku70* d'obtenir un mutant pour l'un des gènes considérés. Par ailleurs, nos résultats suggèrent que, sans être essentiel à la viabilité du champignon, le gène *CDS3212* codant une Cu/Zn-SOD à ancre GPI exprimée spécifiquement en surface des spores pourrait jouer un rôle important dans la virulence du champignon. Ces expériences devront

être poursuivies pour établir le rôle de ce gène. Par ailleurs, le protocole de transformation doit encore être amélioré, compte tenu du rendement limité de la PCR fusion, du nombre limité de protoplastes générés dans nos conditions expérimentales et du nombre restreint de marqueurs de sélection utilisables pour les *Scedosporium* imposant le recours à l'utilisation d'une flippase pour le recyclage de la cassette et l'accès à la complémentation comme à la production de mutants multiples.

6. Utilisation d'inhibiteurs d'enzymes de détoxification des ROS comme antifongiques vis-à-vis des *Scedosporium*

Introduction

Les infections à *Scedosporium* nécessitent une prise en charge thérapeutique adaptée en raison des résistances intrinsèques à de nombreux antifongiques, notamment à l'amphotéricine B (Guarro *et al.* 2006; Gilgado *et al.* 2006; Espinel-Ingroff *et al.* 2008; Lackner *et al.* 2012; Tortorano *et al.* 2014). Le traitement de première intention des scedosporioses repose sur l'administration de voriconazole (Troke *et al.* 2008; Tortorano *et al.* 2014). De nombreuses études ont démontré l'efficacité de cet antifongique sur les différentes espèces du genre *Scedosporium in vitro* et *in vivo* (Capilla et Guarro 2004; Guarro *et al.* 2006; Gilgado *et al.* 2006; Espinel-Ingroff *et al.* 2008; Troke *et al.* 2008; Lackner *et al.* 2012; Lelièvre *et al.* 2013; Martin-Vicente *et al.* 2017). De nombreux retours d'expériences montrent l'efficacité du voriconazole dans diverses infections à *Scedosporium* (Musk *et al.* 2006; Borghi *et al.* 2010; Henao-Martínez *et al.* 2013; Rolfe *et al.* 2013; Oliveira *et al.* 2013; Huguenin *et al.* 2015; Rahman *et al.* 2016; Chen *et al.* 2016; Denton *et al.* 2016; McLaren et Potter 2016; Stoneham *et al.* 2017; Zoroquiain *et al.* 2017). Néanmoins des récidives ont été rapportées après plusieurs mois de traitement par voriconazole, déterminées par le même génotype (Symoens *et al*. 2007). Par ailleurs, le voriconazole induit une photosensibilité (Rondeau *et al.* 2012) et la survenue de tumeurs cutanées a été rapportée dans des traitements au long cours. Enfin, la sensibilité au voriconazole varie selon les souches, certains isolats ont été décrits comme résistants au voriconazole, avec pour conséquence un échec thérapeutique (Espinel-Ingroff *et al.* 2008; Troke *et al.* 2008; Homa *et al.* 2015; Martin-Vicente *et al.* 2017). Martin-Vicente *et al.* (2017) ont démontré qu'une concentration minimale inhibitrice (CMI) inférieure ou égale à 2 µg/mL serait prédictive d'une évolution clinique favorable.

Le posaconazole peut être utilisé en cas d'intolérance ou de résistance au voriconazole. Il présente une certaine efficacité vis-à-vis des *Scedosporium* (Gilgado *et al.* 2006; Guinea *et al.* 2008; Lackner *et al.* 2012; Lelièvre *et al.* 2013; Tortorano *et al.* 2014; Lass-Flörl et Cuenca-Estrella 2017). Il s'est montré efficace dans le traitement d'un abcès cérébral à *Scedosporium* (Mellinghoff *et al.* 2002).

En raison du faible nombre d'antifongiques efficaces sur les *Scedosporium*, la recherche de nouveaux antifongiques est indispensable. Depuis quelques années, plusieurs études ont été réalisées sur des associations d'antifongiques, ou des combinaisons d'antifongiques avec d'autres molécules, notamment des antipsychotiques (Schemuth *et al.* 2013; Lackner *et al.* 2014a; Compain *et al.* 2015; Homa *et al.* 2015). Ainsi, bien que leur intérêt ne soit pas démontré dans des études randomisées, il est recommandé d'utiliser dans les formes sévères, des associations d'antifongiques, voriconazole notamment associé à une échinocandine, voire une triple association (Schwarz *et al.* 2017b).

Des inhibiteurs enzymatiques ciblant les enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydatif ont produit des résultats prometteurs vis-à-vis de différents microorganismes. Nous avons précédemment démontré que les thiorédoxine réductases de *S. apiospermum* étaient particulièrement surexprimées en réponse au stress oxydatif, ce qui suggère qu'elles pourraient constituer une cible thérapeutique. Nous avons donc évalué l'activité de l'auranofin et de l'ebsélen, deux inhibiteurs des thiorédoxine réductases ayant démontré une activité

antimicrobienne sur une large gamme de microorganismes, notamment des levures et des champignons filamenteux ou dimorphiques dont *A. fumigatus, B. dermatitidis, C. albicans, C. glabrata, C. parapsilosis, C. tropicalis, Cr. neoformans, L. prolificans, Scedosporium* spp. et *S. cerevisiae* pour l'auranofin (Hokai *et al.* 2014; Gamberi *et al.* 2015; Fuchs *et al.* 2016; Wiederhold *et al.* 2017b), *A. niger, C. albicans, C. parapsilosis, C. tropicalis, C. gatti, Cr. neoformans, F. chamydosporium, F. oxysporum, F. proliferatum, F. solani, F. sporotrichioides, F. verticilloides, M. gypseum, P. citrinum, P. chrysogenum,* et *S. cerevisiae* pour l'ebsélen (Soteropoulos *et al.* 2000; Wójtowicz *et al.* 2004; Chan *et al.* 2007; Miorelli *et al.* 2008; Billack *et al.* 2009, 2010; Azad *et al.* 2012; Venturini *et al.* 2016; Ngo *et al.* 2016; Chassot *et al.* 2016; Thangamani *et al.* 2017). Une synergie d'action avec certains anti-infectieux a par ailleurs été démontrée pour ces deux molécules (Thangamani *et al.* 2016a; Owings *et al.* 2016; Venturini *et al.* 2016).

Au cours de ce travail, nous avons évalué l'activité de ces deux inhibiteurs de thiorédoxine réductases utilisés isolément ou en association avec des antifongiques conventionnels comme le voriconazole et le posaconazole, vis-à-vis des différentes espèces du genre *Scedosporium*.

Matériels et Méthodes

Microorganismes et conditions de culture

L'étude a été réalisée sur les 21 isolats du genre *Scedosporium* précédemment utilisés dans le cadre de l'étude sur la capacité de germination des spores lors d'un stress oxydatif. Ces isolats sont conservés en glycérol à - 80°C et maintenus en culture sur milieu Potatoe Dextrose Agar (PDA) supplémenté en chloramphénicol 0,5%. Après 9 jours d'incubation à 37°C, les spores sont récupérées en eau distillée stérile et filtrées sur membrane de nylon de 20 µm de porosité, afin d'éliminer les hyphes. Les spores sont dénombrées sur cellule de Malassez, puis mises en suspension à raison de 2 x 10^6 spores par mL en milieu RPMI 1640 (Sigma Aldrich) tamponné à pH 7 par addition de sel sodique de l'acide morpholino-propane sulfonique (MOPS).

Détermination de l'activité antifongique

L'activité antifongique de l'auranofin et de l'ebsélen (Enzo Life Science, Farmingdale, New-York) a été évaluée *in vitro* par dilution en milieu liquide et comparée à celle du voriconazole (Sigma Aldrich, Saint-Louis, Missouri) et du posaconazole (Cayman Chemical, Ann Arbor, Michigan). Ces molécules sont solubilisées dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) à concentration de 5 mg/mL et les solutions obtenues sont conservées à - 20°C sous forme d'aliquotes de 50 µL.

L'activité antifongique a été évaluée par microdilution en milieu liquide selon les recommandations du CLSI (Clinical Laboratory Standard Institute, document M38-A2). A partir des solutions stocks à 5 mg/mL, des dilutions sériées d'ordre 2, de 0,0625 à 32 µg/mL, sont préparées en milieu RPMI 1640-MOPS pour chacune des molécules. Les expériences sont réalisées dans des microplaques 96 puits en duplicats, avec trois réplicats biologiques par isolat. L'inoculum est distribué dans les puits de la microplaque (100 µL à 2 x 10^6 spores par mL), puis un volume équivalent des différentes dilutions d'antifongiques est déposé dans les puits. La croissance est évaluée après 72 h d'incubation à 37°C, par lecture de l'absorbance à 405 nm. Le pourcentage de croissance est déterminé par comparaison avec le contrôle (inoculum en présence d'un volume équivalent de solvant sans

antifongique). A partir des différents réplicats biologiques réalisés, des valeurs moyennes sont calculées pour chaque antifongique et pour chacun des isolats. Les concentrations minimales nécessaires pour obtenir une inhibition de croissance de 50% (CI_{50}), 80% (CI_{80}), et 90% (CI_{90}) par rapport au contrôle sont déterminées.

Evaluation de l'activité de l'auranofin et de l'ebsélen en association avec un triazolé

Nous avons également évalué l'intérêt de l'auranofin en association avec du voriconazole ou du posaconazole est évaluée. Ces expériences ont été conduites sur la souche de référence *S. apiospermum* IHEM 14462, par microdilution en milieu liquide selon la méthode de l'échiquier. Des gammes de dilutions stocks (de 0,01565 à 16 µg/mL) en RPMI 1640-MOPS sont préparées pour chacune des molécules. Les expériences sont réalisées en microplaques 96 puits en duplicats et trois réplicats biologiques sont réalisées. L'activité antifongique est déterminée après 72 h d'incubation à 37°C, par lecture de l'absorbance à 405 nm. A partir du contrôle de croissance, le pourcentage d'inhibition de croissance est déterminé dans chacune des conditions testées, et les CI_{50}, CI_{80} et CI_{90} sont calculées à partir des valeurs moyennes obtenues pour les différents réplicats biologiques. L'effet des associations auranofin + triazole est évalué par détermination du Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index sont déterminés afin d'évaluer *in vitro* l'effet de ces combinaisons (Gopal *et al.* 2014; Stein *et al.* 2015; Amin *et al.* 2015) selon la formule suivante :

FICI= (CMI A combiné avec B/CMI A seul) + (CMI B combiné avec A/CMI B seul), ou A et B sont les deux composés à évaluer.

Cet index permet de caractériser l'interaction entre les deux molécules A et B : on parle de synergie d'action entre ces deux molécules si le FIC index est inférieur à 0,5, d'effet additif si le FIC index est compris entre 0,5 et 1, alors qu'un FIC index compris entre 1 et 3 correspond à l'absence d'interaction entre les deux composés, et qu'un FIC index supérieur à 3 démontre un antagonisme.

Analyses statistiques

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Graphpad prism 6.0 (GraphPad, USA), le test Wilcoxon-Mann Whitney est utilisé pour comparer les CMI. Les résultats sont considérés comme significativement différents pour $p < 0,05$.

Résultats

Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Les CMI sont déterminées pour chacune des molécules, voriconazole, posaconazole, auranofin et ebsélen sur chacun des isolats **(Tableau X)**. Les différents isolats étudiés sont peu sensibles aux deux triazolés testés, comme aux inhibiteurs de thiorédoxine réductases, avec des CI_{90} toujours supérieures ou égales à 16 µg/mL. Le voriconazole est l'antifongique le plus actif sur les différents isolats de *Scedosporium,* avec des CI_{50} en moyenne de 0,5 µg/mL pour les isolats de *S. apiospermum* et *S. boydii,* de 0,25 µg/mL pour les isolats de *S. aurantiacum, S. dehoogii* et *S. minutisporum.* Le posaconazole est moins actif que le voriconazole, avec une CI_{50} comprise entre 0,5 et > 16 g/mL (moyenne de 1 µg/mL) pour les isolats de *S. apiospermum,* entre 0,0625 et 2 g/mL (moyenne de 0,5 µg/mL) pour les quatre autres espèces si l'on excepte un isolat de *S. minutisporum* qui s'est

révélé totalement résistant au posaconazole avec une CI_{50} de 16 µg/mL. L'auranofin présente une activité variable sur les isolats de *S. apiospermum,* avec des CI_{50} allant de 1 à 8 µg/mL, alors que des valeurs beaucoup plus homogènes sont obtenues pour les quatre autres espèces, de 2 µg/mL pour *S. boydii* et de 4 µg/mL pour *S. aurantiacum* et *S. minutisporum* (2 à 4 µg/mL pour *S. dehoogii*). Aucune activité n'est observée pour l'ebsélen qui présente des CI_{50} toujours supérieures ou égales à 16 µg/mL.

Bien que la comparaison des CI_{50} soit largement en défaveur de l'auranofin, il est cependant intéressant de noter qu'à la plus forte concentration utilisée (16 µg/mL), la croissance résiduelle est toujours plus faible en présence d'auranofin que de voriconazole ou posaconazole. A 16 µg/mL d'auranofin, la croissance résiduelle varie selon les isolats et les espèces entre 11 et 22%, alors qu'elle est comprise entre 22 et 40% pour une concentration équivalente de voriconazole, entre 22 et 44% avec le posaconazole.

Evaluation de l'intérêt de l'association de l'auranofin avec des triazolés.

En se basant sur les CI_{50}, il est à noter que l'auranofin et le voriconazole ont un effet additif avec un FIC index de 0,75 pour deux associations **(Tableau XI)** . Ces effets additifs sont obtenus avec l'association de 0,5 µg/mL d'auranofin et de 0,25 µg/mL de voriconazole ou de 1 µg/mL d'auranofin et de 0,125 µg/mL de voriconazole, alors que les CI_{50} de l'auranofin et du voriconazole utilisés isolément sont de 2 et 0,5 µg/mL, respectivement. L'analyse des résultats correspondant à une diminution de la croissance de 80% ne montre aucun effet additif pour toutes les combinaisons testées.

Sur la base des CI_{50}, l'auranofin et le posaconazole présentent un effet additif pour 8 combinaisons **(Tableau XII)**. Un FIC index voisin de 0,5, donc proche d'un effet synergique, est observé pour trois de ces combinaisons associant 0,0625 µg/mL d'auranofin et 0,5 µg/mL de posaconazole (FIC index = 0,53), 0,125 µg/mL d'auranofin et 0,0625 µg/mL de posaconazole (FIC index = 0,56), et 1 µg/mL d'auranofin et 0,0625 µg/mL de posaconazole (FIC index = 0,56). Un effet additif également observé entre l'auranofin et le posaconazole pour deux combinaisons si l'on considère les CI_{80} **(Tableau XIII)**, pour des associations d'auranofin et de posaconazole de 0,5 µg/mL + 1 µg/mL ou de 1 µg/mL + 0,5 µg/mL (FIC index = 0,75).

Discussion

Nos résultats confirment la plus forte activité du voriconazole vis-à-vis des *Scedosporium* face au posaconazole. Néanmoins, nous n'avons jamais observé d'inhibition totale de la croissance fongique pour les isolats étudiés, et les CI_{90} se sont toujours révélées très élevées. Les CI_{50} que nous avons obtenues sont en accord avec celles rapportées dans la littérature pour le de voriconazole et le posaconazole (Gilgado *et al.* 2006; Espinel-Ingroff *et al.* 2008; Lackner *et al.* 2012; Biswas *et al.* 2013; Compain *et al.* 2015; Homa *et al.* 2015; Wiederhold *et al.*2017a,b; Mello *et al.* 2016).

Récemment, Wiederhold *et al.* (2017b) ont évalué l'activité de l'auranofin sur 7 isolats de *S. apiospermum.* Des CI_{50} comprises entre 1 et 4 µg/mL ont été rapportées, avec une moyenne géométrique de 3,59 µg/mL. Dans notre étude menée sur 21 isolats correspondant aux 5 principales espèces du genre *Scedosporium*, nous avons observé des CI_{50} comprises entre 1 et 8 µg/mL, avec une moyenne géométrique un peu plus faible, de 2,87 µg/mL. La distribution des CI_{50} de l'auranofin suit une distribution normale, comme celles du voriconazole. Les CI_{50} du posaconazole montrent la présence de deux populations d'isolats, la seconde

présentant une résistance marquée à cet antifongique comme décrit par Lackner *et al.* (2012). Nous n'avons pas observé de différence significative dans la sensibilité aux molécules testées entre les isolats cliniques et environnementaux comme entre les différentes espèces de *Scedosporium* comme décrit précédemment (Nweze et Okafor 2010; Lackner *et al.* 2012, 2014b). Ici, nous avons évalué l'activité antifongique sur des conidies, et des expériences similaires devront être conduites sur des tubes germinatifs. Il a en effet été démontré une variation de la sensibilité aux antifongiques en fonction du stade morphologique chez certaines espèces fongiques, avec un effet antifongique plus important du voriconazole sur les tubes germinatifs (Mello *et al.* 2016).

Venturini *et al.* (2016) ont évalué l'activité antifongique de l'ebsélen sur plusieurs isolats de *Fusarium* et rapporté des CI_{90} de 8 µg/mL pour les isolats les moins sensibles. Cette molécule agirait en inhibant la thioredoxine réductase d'*E. coli* et l'ATPase chez les levures (Nozawa *et al.* 1989; Soteropoulos *et al.* 2000; Chan *et al.* 2007; Lu *et al.* 2013; Gustafsson *et al.* 2016). Selon d'autres publications, l'ebsélen mimerait l'activité peroxydase de la glutathion peroxydase (Orian et Toppo 2014). Chez les bactéries, il s'est montré actif contre les bactéries à Gram +, et présente une activité synergique avec de nombreux antibiotiques (Thangamani *et al.* 2016b, 2017a,b). Néanmoins, nos expériences n'ont pas montré d'activité antifongique vis-à-vis des *Scedosporium*.

Un effet additif a été observé pour des combinaisons auranofin-voriconazole et auranofin-posaconazole. Ces résultats obtenus sur une seule souche de *S. apiospermum* devront être confirmés sur des isolats cliniques de *S. apiospermum*, mais aussi de *S. boydii* et *S. aurantiacum*.

L'amphotéricine B est un polyène formant des pores dans la membrane plasmique en se liant à l'ergostérol membranaire, entraînant ainsi la mort de la cellule fongique (Ellis 2002). Peu de résistances acquises ont été rapportées en dépit de la très large utilisation de cet antifongique depuis une cinquantaine d'années (Kovacicova *et al.* 2001; Cannon *et al.* 2007). Par contre, certaines espèces comme *A. terreus, L. prolificans,* les *Fusarium* et les *Scedosporium,* présentent une résistance intrinsèque à l'amphotéricine B. Il a été démontré que l'amphotéricine B induisait un stress oxydatif (Sokol-Anderson *et al.* 1986, 1988, González-Párraga *et al.* 2003, 2011; Phillips *et al.* 2003; Sangalli-Leite *et al.* 2011; Mesa-Arango *et al.* 2014; Blatzer *et al.* 2015; Román *et al.* 2016; Guirao-Abad *et al.* 2017). Des études ont également démontré une surexpression de gènes codant des catalases et superoxyde dismutases, en particulier les Mn-SOD, en réponse à l'amphotéricine B (Sokol-Anderson *et al.* 1986, 1988; González-Párraga *et al.* 2011; Mesa-Arango *et al.* 2014; Guirao-Abad *et al.* 2017). La résistance à l'amphotéricine B est d'ailleurs associée à une forte catalasique et une diminution du taux de ROS (Kim *et al.* 2012a; Blum *et al.* 2013; Vincent *et al.* 2013; Linares *et al.* 2013; Mesa-Arango *et al.* 2014; Blatzer *et al.* 2015). Enfin, le 2,3 dihydroxybenzaldéhyde, qui est connu pour interférer avec la réponse au stress oxydatif chez les champignons, augmente l'activité antifongique de l'amphotéricine B (Kim *et al.* 2012). Des associations amphotéricine B-auranofin devraient aussi être étudiées afin de déterminer si les thiorédoxine réductases jouent un rôle dans la résistance des *Scedosporium* à l'amphotéricine B et si leur inhibition peut lever la résistance.

L'auranofin est connu pour inhiber l'activité des thiorédoxine réductases de diverses bactéries, mais aussi de certains champignons et parasites. *In vitro*, l'auranofin utilisé isolément ou en association avec le voriconazole ou la posaconazole ne montre qu'une activité limitée. Seuls des effets additifs ont été observés. Néanmoins, nous avons montré que les thiorédoxine réductases de *S. apiospermum* étaient fortement surexprimées en réponse au stress oxydatif. Des études complémentaires visant à évaluer l'activité de l'auranofin vis-à-vis des *Scedosporium*

devraient être conduites dans des conditions de stress oxydatif, par détermination des CMI de l'auranofin en présence de ménadione par exemple. L'efficacité de l'auranofin administré isolément ou en association avec un triazolé devrait également être évaluée dans un modèle expérimental de scédosporiose disséminée utilisant des animaux immunocompétents. Par la suite il serait également intéressant d'étudier l'expression des gènes impliqués dans la réponse au stress oxydatif en présence d'amphotéricine B, afin de déterminer si elles participent à la résistance de *S. apiospermum* aux polyènes.

Tableau X: Activité de l'auranofin et de l'ebsélen comparée à celle du voriconazole et du posaconazole sur différents isolats de *Scedosporium*.

Isolats	*Voriconazole*			*Posaconazole*			*Auranofin*			*Ebsélen*		
	CI_{50}	CI_{80}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{80}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{80}	CI_{90}	CI_{50}	CI_{80}	CI_{90}
S. apiospermum												
IHEM 14268	0,5	> 16	> 16	1	> 16	> 16	8	> 16	> 16	16	16	16
IHEM 14462	0,5	1	> 16	2	4	> 16	2	4	> 16	4	16	> 16
IHEM 23580	0,125	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16	2	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
UA120217796/2	0,5	> 16	> 16	0,5	4	> 16	1	4	16	16	16	> 16
UA120218482/4	0,25	2	> 16	1	> 16	> 16	4	8	> 16	4	> 16	> 16
S. aurantiacum												
IHEM 23578	0,0625	> 16	> 16	1	16	> 16	4	4	16	16	> 16	> 16
707 660	0,25	> 16	> 16	0,5	8	> 16	4	8	> 16	16	> 16	> 16
UA110349103-01/1	0,25	16	> 16	0,5	> 16	> 16	4	4	> 16	16	> 16	> 16
UA110349103-01/3	0,125	1	> 16	0,5	> 16	> 16	4	4	> 16	16	> 16	> 16
UA120008824-01/1	0,125	2	> 16	1	2	16	4	4	16	16	> 16	> 16
S. boydii												
IHEM 15555	4	> 16	> 16	2	> 16	> 16	2	2	> 16	> 16	> 16	> 16
IHEM 23574	0,5	> 16	> 16	0,5	16	> 16	2	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
IHEM 23837	0,0625	> 16	> 16	0,0625	0,5	> 16	2	> 16	> 16	16	> 16	> 16
UA120217796/1	0,25	2	> 16	0,5	1	> 16	2	4	> 16	16	> 16	> 16
UA120218478/1	0,5	> 16	> 16	1	> 16	> 16	2	8	> 16	> 16	> 16	> 16
S. dehoogii												
UA110354521-01/2	0,25	> 16	> 16	0,5	> 16	> 16	2	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
UA110350905-01/1	1	> 16	> 16	1	> 16	> 16	4	8	> 16	> 16	> 16	> 16
UA110354504-01/1	0,25	> 16	> 16	0,25	> 16	> 16	4	> 16	> 16	> 16	> 16	> 16
UA120008799-01/1	0,25	> 16	> 16	0,5	> 16	> 16	2	4	> 16	> 16	> 16	> 16
S. minutisporum												
IHEM 23833	0,25	> 16	> 16	16	> 16	> 16	4	16	> 16	> 16	> 16	> 16
UA110350824-01/3	0,25	1	> 16	0,25	4	> 16	4	8	> 16	16	> 16	> 16

Tableau XI: Interactions entre l'auranofin et le voriconazole aux CI_{50}

Auranofin (µg/mL) \ CI_{50}	Voriconazole (µg/mL)										
	0	0,015625	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
0	103	106	101	100	74	50	29	13	22	25	20
0,015625	102	-	-	-	-	-	1,01	2,01	4,01	8,01	16,01
0,03125	98	-	-	-	-	-	1,02	2,02	4,02	8,02	16,02
0,0625	100	-	-	-	-	-	1,03	2,03	4,03	8,03	16,03
0,125	97	-	-	-	-	-	1,06	2,06	4,06	8,06	16,06
0,25	99	-	-	-	-	-	1,13	2,13	4,13	8,13	16,13
0,5	88	-	-	-	-	0,75	1,25	2,25	4,25	8,25	16,25
1	77	-	-	-	0,75	1,00	1,50	2,50	4,50	8,50	16,50
2	34	1,03	1,06	1,13	1,25	1,50	2,00	3,00	5,00	9,00	17,00
4	11	2,03	2,06	2,13	2,25	2,50	3,00	4,00	6,00	10,00	18,00
8	11	4,03	4,06	4,13	4,25	4,50	5,00	6,00	8,00	12,00	20,00

Les données correspondent aux valeurs de FIC index. Les CI_{50} de l'auranofin et du voriconazole utilisés isolément sont indiquées en bleu et les associations présentant un effet additif (FIC index compris entre 0,5 et 1) en rouge.

Tableau XII : Interactions entre l'auranofin et le posaconazole aux CI_{50}

		Posaconazole (µg/mL)										
	CI_{50}	0	0,015625	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
Auranofin (µg/mL)	0	110	99	92	93	90	77	50	22	20	20	22
	0,015625	106	-	-	-	-	-	-	1,01	2,01	4,01	8,01
	0,03125	106	-	-	-	-	-	-	1,02	2,02	4,02	8,02
	0,0625	105	-	-	-	-	-	0,53	1,03	2,03	4,03	8,03
	0,125	99	-	-	-	-	-	0,56	1,06	2,06	4,06	8,06
	0,25	99	-	-	-	-	-	0,63	1,13	2,13	4,13	8,13
	0,5	93	-	-	-	-	-	0,75	1,25	2,25	4,25	8,25
	1	85	-	-	0,56	0,63	0,75	1,00	1,50	2,50	4,50	8,50
	2	8	1,02	1,03	1,06	1,13	1,25	1,50	2,00	3,00	5,00	9,00
	4	10	2,02	2,03	2,06	2,13	2,25	2,50	3,00	4,00	6,00	10,00
	8	10	4,02	4,03	4,06	4,13	4,25	4,50	5,00	6,00	8,00	12,00

Les données correspondent aux valeurs de FIC index. Les CI_{50} de l'auranofin et du posaconazole utilisés isolément sont indiquées en bleu et les associations présentant un effet additif (FIC index compris entre 0,5 et 1) en rouge.

Tableau XIII : Interactions entre l'auranofin et le posaconazole aux CI_{80}

		Posaconazole (µg/mL)										
	CI_{80}	0	0,015625	0,03125	0,0625	0,125	0,25	0,5	1	2	4	8
Auranofin (µg/mL)	0	110	99	92	93	90	77	50	22	20	20	22
	0,015625	106	-	-	-	-	-	-	-	1,01	2,01	4,01
	0,03125	106	-	-	-	-	-	-	-	1,02	2,02	4,02
	0,0625	105	-	-	-	-	-	-	-	1,03	2,03	4,03
	0,125	99	-	-	-	-	-	-	-	1,06	2,06	4,06
	0,25	99	-	-	-	-	-	-	-	1,13	2,13	4,13
	0,5	93	-	-	-	-	-	-	0,75	1,25	2,25	4,25
	1	85	-	-	-	-	-	0,75	1,00	1,50	2,50	4,50
	2	8	1,01	1,02	1,03	1,06	1,13	1,25	1,50	2,00	3,00	5,00
	4	10	2,01	2,02	2,03	2,06	2,13	2,25	2,50	3,00	4,00	6,00
	8	10	4,01	4,02	4,03	4,06	4,13	4,25	4,50	5,00	6,00	8,00

Les données correspondent aux valeurs de FIC index. Les CI_{80} de l'auranofin et du posaconazole utilisés isolément sont indiquées en bleu et les associations présentant un effet additif (FIC index compris entre 0,5 et 1) en rouge.

7. Standardisation du sérodiagnostic des scédosporioses

Scedosporium boydii CatA1 and SODC recombinant proteins, new tools for serodiagnosis of *Scedosporium* infection of patients with cystic fibrosis

Sara Mina[1,2,♯], Cindy Staerck[1,♯], Agnès Marot[1], Charlotte Godon[1], Alphonse Calenda[1], Jean-Philippe Bouchara[1,3] and Maxime J.J. Fleury[1,*]

♯, These authors contributed equally to this work

1, Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), UNIV Angers, UNIV Brest, Université Bretagne-Loire, Angers, France

2, Beirut Arab University, Faculty of Health Sciences, Beirut, Lebanon

3, Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

Accepté pour publication dans Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, le 21 Août 2017

Résumé

Les espèces *Scedosporium* se situent au deuxième rang des champignons filamenteux capable de coloniser les voies respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose, après *A. fumigatus.* Ces champignons chez les patients atteints de mucoviscidose génèrent une grande variété d'infections, similaires à celles dues à *A. fumigatus.* Le diagnostic de ces infections se fait par la détection d'anticorps dirigés contre des extraits antigéniques totaux. Cependant, de nombreux composants de ces extraits antigéniques sont communs entre *A. fumigatus* et *Scedosporium*, aboutissant à des réactions croisées. Dans cette étude nous avons produite 5 protéines recombinantes de *S. apiospermum* ou *S. boydii*, puis évalué leur intérêt pour le développement d'un test de sérodiagnostic des infections à *Scedosporium* en utilisant une technique ELISA. Deux de ces protéines, la catalase A1 et la Cu/Zn-SOD cytosolique recombinantes ont permis la détection des sérums de patients infectés par *Scedosporium,* mais également de les différencier de celles à *A. fumigatus.* Ces deux protéines recombinantes pourraient être utilisées pour le développement d'un test sérologique standardisé, sensible et spécifique des infections à *Scedosporium*.

Mots-clés: *Scedosporium* sp; Mucoviscidose, Sérodiagnostic, Catalase, Cu/Zn-superoxyde dismutase, Protéines recombinantes

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease xxx (2017) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Diagnostic Microbiology and Infectious Disease

journal homepage: www.elsevier.com/locate/diagmicrobio

Scedosporium boydii CatA1 and SODC recombinant proteins, new tools for serodiagnosis of *Scedosporium* infection of patients with cystic fibrosis☆

Sara Mina [a,b,1], Cindy Staerck [a,1], Agnès Marot [a], Charlotte Godon [a], Alphonse Calenda [a], Jean-Philippe Bouchara [a,c], Maxime J.J. Fleury [a,*]

[a] Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), UNIV Angers, UNIV Brest, Université Bretagne-Loire, Angers, France
[b] Beirut Arab University, Faculty of Health Sciences, Beirut, Lebanon
[c] Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

ARTICLE INFO

Article history:
Received 4 June 2017
Received in revised form 18 August 2017
Accepted 21 August 2017
Available online xxxx

Keywords:
Scedosporium species
Cystic fibrosis
Serodiagnosis
Catalase
Cu,Zn superoxide dismutase, recombinant proteins

ABSTRACT

Scedosporium species rank the second among the filamentous fungi colonizing the airways of patients with cystic fibrosis (CF), after *Aspergillus fumigatus*. In CF, these fungi may cause various respiratory infections similar to those caused by *A. fumigatus*, including bronchitis and allergic broncho-pulmonary mycoses. Diagnosis of these infections relies on the detection of serum antibodies using crude antigenic extracts. However, many components of these extracts are common to *Scedosporium* and *Aspergillus* species, leading to cross-reactions. Here, 5 recombinant proteins from *S. apiospermum* or *S. boydii* were produced, and their value in serodiagnosis of *Scedosporium* infections was investigated by enzyme-linked immunosorbent assay. Two of them, corresponding to the *Scedosporium* catalase A1 or cytosolic Cu,Zn-superoxyde dismutase, allowed the detection of *Scedosporium* infection, and the differentiation with an *Aspergillus* infection. These recombinant proteins therefore may serve as a basis for the development of a standardized serological test.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Although usually saprophytes commonly found in contaminated soils and polluted water (Rougeron et al., 2015), *Scedosporium* species may be responsible of a wide spectrum of infections ranging from subcutaneous mycetoma to disseminated infections in immunocompromised patients (Cortez et al., 2008; Guarro et al., 2006). The genus *Scedosporium* is composed at least of 10 species with 5 principal species: *Scedosporium apiospermum*, *Scedosporium boydii*, *Scedosporium aurantiacum*, *Scedosporium minutisporum* and *Scedosporium dehoogii*, are known today in the genus *Scedosporium* (Gilgado et al., 2005, 2008; Lackner et al., 2014b). Among these, *S. boydii* and *S. apiospermum* which are very close phylogenetically, are the main pathogenic species in Europe (Sedlacek et al., 2015; Ziesing et al., 2016; Zouhair et al., 2013).

In patients with cystic fibrosis (CF), the prognosis essentially depends on pulmonary lesions, which result from the frequent colonization of the airways by bacteria or filamentous fungi and the subsequent inflammatory reaction. Among filamentous fungi colonizing the CF airways, *Scedosporium* species rank the second, after *Aspergillus fumigatus* (Pihet et al., 2009; Borman et al., 2010) with a prevalence ranging from 2% to 17.4% (Blyth et al., 2010; Cimon et al., 1995, 2000; Heath et al., 2009; Manso et al., 2011; Paugam et al., 2010; Sedlacek et al., 2015; Ziesing et al., 2016). In CF, these fungi are usually responsible for a chronic colonization of the airways (Defontaine et al., 2002; Zouhair et al., 2013), which may sometimes lead to true respiratory infections, similar to those caused by *A. fumigatus* like bronchitis and allergic broncho-pulmonary mycoses (Cimon et al., 2000; Vázquez-Tsuji et al., 2006). In addition, several cases of severe disseminated infections have been reported in CF patients following lung transplantation (Castiglioni et al., 2002; Husain et al., 2005; Morio et al., 2010; Sahi et al., 2007; Symoens et al., 2006).

Very few biochemical studies have been performed so far regarding *Scedosporium* species. These studies focused on the cell wall polysaccharides (β-glucans, rhamnomannans and peptidorhamnomannans) and glycolipids (glycosylceramides) (Pinto et al., 2002). In addition, hydrolytic enzymes thought to be involved in the host tissue invasion such as the major alkaline protease Alp1 (Larcher et al., 1996), some metalloproteases (Pereira et al., 2009; Silva et al., 2011) and phosphatases (Kiffer-Moreira et al., 2007) have been identified, as well as enzymes possibly involved in evasion to the host oxidative response including a cytosolic Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD)

☆ AM, AC, JPB and MJJF are members of the ECMM/ISHAM (European Confederation of Medical Mycology/International Society for Human and Animal Mycology) working group *Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis* (*Fri-CF*).

* Corresponding author. Tel.: +33-2-44-68-83-68.
E-mail address: maxime.fleury@univ-angers.fr (M.J.J. Fleury).

[1] These authors contributed equally to this work.

https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2017.08.013
0732-8893/© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

called SODC (Lima et al., 2007) and 3 catalases (Mina et al., 2015a). Nevertheless, until recently, only 3 *Scedosporium* proteins have been identified and fully characterized, namely Alp1, SodC and the major catalase called CatA1 (Larcher et al., 1996; Lima et al., 2007; Mina et al., 2015a), and only 2 genes, encoding the last 2 proteins, were sequenced (Lima et al., 2007; Mina et al., 2015b).

The diagnosis of fungal infections is currently based on the detection of serum antibodies produced against the causative agent using crude antigenic extracts. No standardized kits are commercialized today for serodiagnosis of *Scedosporium* infections, which is performed only in specialized laboratories, and counter-immunoelectrophoresis (CIE) is currently the unique method available (Chabasse et al., 1991; Cimon et al., 1995, 2000). Nevertheless, many proteins or polysaccharides are shared by *A. fumigatus* and *Scedosporium* species, which therefore may lead to immune cross-reactions in routine serological tests and false positive serological results. Cross-reactions in serodiagnosis of *Aspergillus* infections using crude antigenic extracts have been reported with related taxa belonging to the Eurotiomycetes or even with some dematiaceous fungi like the Sordariomycete *Stachybotrys atra* (Piechura et al., 1985; Vojdani, 2004), and therefore may occur with other Sordariomycetes like *Scedosporium* species. Therefore, it may be difficult to differentiate a *Scedosporium* infection from an *Aspergillus* infection while treatment of their treatment may be really different. Indeed, whereas *A. fumigatus* is usually susceptible to voriconazole or the echinocandins, *Scedosporium* species exhibit a very low susceptibility to all current systemic antifungals (Alastruey-Izquierdo et al., 2007; Gilgado et al., 2006; Lackner et al., 2014a), leading clinicians to consider these fungi as therapy-refractory pathogens (Guarro et al., 2006) and to use double or triple combinations of antifungals in some cases (Schwarz et al., 2017).

Antibodies directed towards *A. fumigatus* dipeptidylpeptidase (DPP) V (initially considered as a chymotrypsin) or catalase A1 are well-known markers of an *Aspergillus* infection since the works of Biguet et al. (1967) and Tran Van Ky et al. (1968). In addition, in *A. fumigatus*-colonized CF patients, anti-catalase A1 antibodies were shown to be associated with a poor lung function (Schønheyder et al., 1988), and among the 8 recombinant proteins evaluated by Sarfati et al. (2006), rCatA1 and rDPPV revealed to be promising tools for serodiagnosis of *Aspergillus* infections. Comparative analysis of the catalase A1 protein sequences from *S. boydii* and *A. fumigatus* showed that there were enough differences between them to develop a sensitive and specific serological test. This was further supported by the specificity of an ELISA assay previously developed using the purified native *S. boydii* catalase A1 (Mina et al., 2015a). Whatever the *Scedosporium* species involved, sera from *Scedosporium*-infected patients were clearly differentiated from those of patients with an *Aspergillus* infection. In the present study, 5 recombinant proteins were produced derived from *S. boydii* catalase A1 or from other *Scedosporium* proteins potentially interesting for serodiagnosis, i.e. DPPV, but also SODC and Alp1 since homologous proteins in *A. fumigatus* (called Asp f 13 for Alp1) were shown to be major antigens/allergens for this fungus (Gautam et al., 2007; Hamilton et al., 1995, 1996). Using these recombinant proteins, we investigated the antibody response in several groups of CF patients with or without an *A. fumigatus* or a *Scedosporium* infection, and evaluated their value as serodiagnostic tools to discriminate *Aspergillus* and *Scedosporium* infections and to differentiate between an airway colonization by *Scedosporium* species and a respiratory infection.

2. Materials and methods

2.1. Production of S. boydii CatA1 recombinant protein in Pichia pastoris

Pichia pastoris GS115 strain and pHIL-D2 expression vector (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) were used to produce recombinant *S. boydii* *Sb*CatA1 with an histidine tag, r*Sb*CatA1-$(His)_6$. A *P. pastoris* codon-optimized version of *S. boydii CATA1* coding sequence (Genbank accession number KR105769) was synthesized by Genscript (Piscataway, NJ). This codon-optimized catalase A1 was cloned into EcoRI site of the pHILD-2 plasmid. The pHIL-D2 recombinant plasmid carrying the *SbCATA1-$(His)_6$* gene was used to transform *P. pastoris* according to the manufacturer's recommendations (Invitrogen).

For protein production, a single colony was inoculated in 10 mL Yeast extract-Peptone-Dextrose broth and incubated for 2 days while shaking (150 rpm) at 30 °C. One milliliter was added to 50 mL BMY medium [Yeast extract 1%, peptone 2%, potassium phosphate 100 mM pH 6, Yeast nitrogen base 1.34%, biotine 4×10^{-5}%] supplemented with glycerol 1% and incubated for 24 h at 30 °C. After centrifugation (10 min, 3000 *g*), the pellet was washed twice with sterile water. Cells were re-suspended ($A_{600} = 1.5$) in 50 mL BMY medium supplemented with methanol 0.5% and incubated for 3 additional days while shaking (150 rpm) at 30 °C with daily additions of 1 mL methanol to induce the protein production. The culture was then centrifuged (10 min, 3000×*g*) and the recombinant protein was purified from the supernatant on high affinity Ni-charged resin according the manufacturer's instructions (GenScript). Purification of r*Sb*CatA1-$(His)_6$ was checked by 12.5% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and its concentration was determined using the Qubit® 2.0 Fluorometer (Invitrogen).

2.2. Production of S. boydii CatA1 and SODC and S. apiospermum Alp1 and DPPV recombinant proteins in ***Escherichia coli***

Escherichia coli BL21(DE3) (Invitrogen) and the expression vector pET26b(+) (Novagen, Merck Millipore, Carlsbad, CA) were used to express *Sb*CatA1, *Sb*SODC, *Sa*Alp1 and *Sa*DPPV recombinant proteins with a glutathione-S-transferase (GST) tag. Optimized coding sequence for *GST* expression *in E. coli* was cloned into pET26b(+) between NdeI and BamHI restriction sites. *CATA1*, *SODC*, *ALP1* and *DPPV* coding sequences were synthesized as codon-optimized genes for expression in *E. coli* (Genscript). The sequences were synthesized based on the original nucleotide sequence of *S. boydii CATA1* (accession number KR105769) or *SODC* (Lima et al., 2007) gene, or on *S. apiospermum ALP1* (SAPIO_CDS3715) or *DPPV* (SAPIO_CDS5066) coding sequences. As the first amino acids of the deduced protein sequences (29 for CatA1, 21 for Alp1 and 26 for DPPV) contained a predicted signal peptide motif, the corresponding nucleotides were removed from the gene sequence. DNA fragments were cloned with *GST* tag into pET26b(+). Transformants were then confirmed by restriction enzyme digestion as containing an insert of the correct size. To express these recombinant proteins and GST (control), the constructed recombinant plasmids pET26b(+) carrying either *GST-SbCATA1*, *GST-SbSODC*, *GST-SaALP1*, *GST-SaDPPV* or the *GST* gene were transformed into *E. coli* BL21(DE3) strains.

For protein production, bacteria were grown overnight at 37 °C in 5 ml of Luria Broth with 50 μg/ml kanamycin. One milliliter of the culture was then added to 30 ml of the same medium which were incubated while shaking (250 rpm) at 37 °C to reach an absorbance value of 0.5 at 600 nm. Protein synthesis was induced with 1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyronoside. After 3 h of incubation while shaking (150 rpm) at 30 °C, cells were collected and resuspended in 5 ml phosphate buffered saline 0.15 M pH 7.2 (PBS) with protease inhibitors (*Complete EDTA free*, Roche, France). Cells were then sonicated on ice (3 × 30 s at a setting of 8 and 70% duty cycle; Branson Sonifier 450, Fisher Scientific, Illkirch, France), and the lysate was centrifuged (10 min, 10,000 g, 4 °C). Recombinant proteins were purified from the supernatant by affinity chromatography on immobilized glutathione according to the manufacturer's instructions (Genscript). Purification was assessed by SDS-PAGE and concentration of the recombinant proteins was determined as previously described.

2.3. Human sera

A panel of 182 serum samples from CF patients was used to evaluate the value of the obtained recombinant proteins. As described previously

(Mina et al., 2015a), serum samples were categorized on the basis of the results of mycological examination of respiratory secretions and the antibody response against *A. fumigatus* and *S. boydii* by routine serological procedures, i.e. CIE using crude antigenic extracts. Four groups of sera were defined. Group A (control; n = 105) consisted of sera from CF patients without any filamentous fungus recovered from sputum samples during the 6 months preceding or following blood sampling, and without serum antibodies directed towards *A. fumigatus* and *S. boydii*. Sera from group B (*A. fumigatus*-infected patients; n = 52) were obtained from patients with *A. fumigatus* being the only filamentous fungus recovered from respiratory secretions, and with a positive antibody response only against *A. fumigatus* crude antigenic extract. Group C (*Scedosporium*-colonized group; n = 7) and group D (*Scedosporium*-infected group; n = 17) consisted of sera from patients with exclusive recovery of a *Scedosporium* species from respiratory secretions and without serum anti-*Scedosporium* antibodies for Group C, or with a serological response against *S. boydii* antigenic extract for Group D.

2.4. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

ELISA was performed as described before with few modifications (Mina et al., 2015a), by coating wells of microtiter plates (Microlon 200, Greiner, Dutscher, Brumath, France) for 3 h at 37 °C with 200 ng per well of recombinant proteins diluted in 50 mM carbonate–bicarbonate buffer pH 9.6. Thereafter, plates were washed 3 times with PBS and then blocked by the addition of a 3% BSA solution in PBS (250 µl per well). After an overnight incubation at 4 °C, and 3 washes with PBS containing 0.05% Tween 20 (PBST), 100 µl of a 1:800 dilution of human sera in PBST supplemented with 0.3% BSA (PBST-BSA) was added to the well (in duplicate, and in parallel in recombinant protein-coated wells and in controls wells). After 1 h of incubation at 37 °C and 3 washes with PBST, horseradish peroxidase-conjugated goat anti-human IgG + A + M (H + L) (Invitrogen) at a 1:8000 dilution in PBST-BSA was added to each well (100 µl per well). After an additional 1-h incubation at 37 °C and washing, peroxidase was revealed using 0.75 mg/ml o-phenylenediamine tetrahydrochloride (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and 0.1% H_2O_2 in 0.15 M citrate–phosphate buffer pH 5.0 (200 µl per well). Plates were incubated at room temperature in the dark for 10 min, the reaction was stopped by the addition of 1 M H_2SO_4 (50 µl) and the absorbance was measured at 492 nm using a microtiter plate reader (Elx800, Bio-Tek instruments, Colmar, France). rGST was included as control. For data analysis, absorbance values obtained for control wells were subtracted from values obtained for wells coated with recombinant proteins. ELISA cut-off values were calculated according to the proven formula: control sera (group A) mean absorbance value plus 3 standard deviations. Statistical analysis was performed using the Wilcoxon-Mann Whitney test and results were considered significantly different when $p < 0.01$.

3. Results

3.1. Production of Scedosporium recombinant proteins

r*Sb*CatA1-$(His)_6$ was produced in *P. pastoris* and purified using the histidine tag, whereas the other recombinant proteins, including rGST, were produced in *E. coli* and purified using the GST tag (Fig. 1A). All purified recombinant proteins showed, by SDS-PAGE, a molecular mass consistent with the expected mass (100, 45, 60, 100 and 26 kDa for rGST-*Sb*CatA1, rGST-*Sb*SODC, rGST-*Sa*Alp1, rGST-*Sa*DDPV and rGST, respectively), except r*Sb*CatA1-$(His)_6$ which exhibited a molecular mass of 100 kDa instead of the 80-kDa expected mass (Fig. 1B). Production yield ranged between 1 and 2 mg/L for all recombinant proteins.

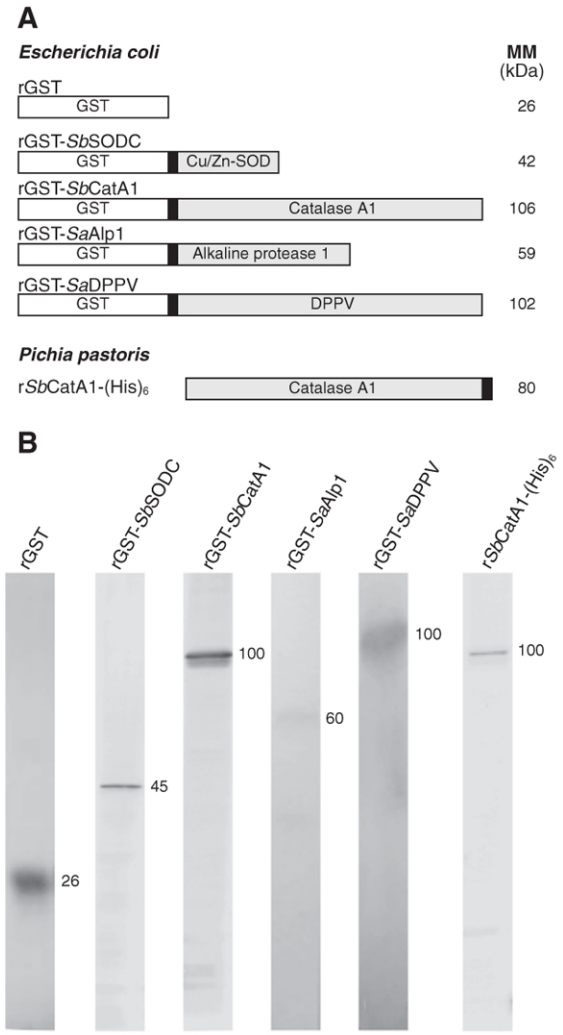


Fig. 1. Schematic representation (**A**) and SDS-PAGE analysis (**B**) of the recombinant proteins produced in *Escherichia coli* or *Pichia pastoris*. GST tag is represented by empty rectangles, target proteins by gray rectangles and $(His)_6$ tag by a solid black rectangle. The estimated molecular mass (MM) in kDa is presented on the left side of Fig. 1A. SDS-PAGE analysis of purified recombinant proteins revealed for most of the recombinant proteins a molecular mass consistent with the expected one, e.g. 26 kDa for rGST, 45 kDa for rGST-*Sb*SODC (42 kDa expected), 100 kDa for purified rGST-*Sb*CatA1 (106 kDa expected), 60 kDa for purified rGST-*Sa*Alp1 (59 kDa expected), and 100 kDa for purified rGST-*Sa*DPPV (102 kDa expected). By contrast, purified r*Sb*CatA1-$(His)_6$, produced in *P. pastoris*, revealed by SDS-PAGE analysis a molecular mass 20 kDa higher than the expected mass.

3.2. Reactivity of human sera against Scedosporium recombinant proteins

We first evaluated by ELISA the ability of sera from CF patients infected by *Scedosporium* species (group D; n = 17) to react with the recombinant proteins. None of these sera reacted with r*Sb*CatA1-$(His)_6$ whereas 15 of them gave a signal using rGST-*Sb*CatA1. We therefore focused on the *E. coli* system for production of the recombinant proteins. Fifteen out of the 17 sera also reacted against rGST-*Sb*SODC, 14 of them producing a signal with both rGST-*Sb*CatA1 and rGST-*Sb*SODC. Only 8 and 10 of the sera showed a signal using rGST-*Sa*Alp1 and rGST-*Sa*DDPV, respectively. Therefore, rGST-*Sb*CatA1 and rGST-*Sb*SODC were selected for further analysis.

Sera from CF patients from group A (control; n = 105), group B (*A. fumigatus*-infected patients, n = 52), group C (*Scedosporium*-colonized

patients; n = 7), and group D (*Scedosporium*-infected patients; n = 17) were tested by ELISA using the 2 selected recombinant proteins, rGST-*Sb*CatA1 (Fig. 2A) and rGST-*Sb*SODC (Fig. 2B). Geometric means of the absorbance values obtained for the 4 groups of patient sera are presented in Table 2. Sera from CF patients infected by *Scedosporium* species (group D) showed absorbance values 4 to 5 fold higher than sera from the 3 other patient groups, with significant difference compared to group A ($p < 9.8\ 10^{-11}$ and $p < 1.8\ 10^{-10}$), group B ($p < 5.4\ 10^{-8}$ and $p < 2.3\ 10^{-8}$) or group C ($p < 2.3\ 10^{-5}$ and $p < 2.3\ 10^{-5}$) patients with rGST-*Sb*CatA1 and with rGST-*Sb*SODC, respectively.

3.3. rGST-SbCatA1 and rGST-SbSODC are valuable tools for serodiagnosis of a Scedosporium infection

To evaluate the value of these proteins as serodiagnostic tools for *Scedosporium* infections, ELISA absorbance cut-off values for positivity were calculated for each recombinant protein (Fig. 2). Using these cut-off values, no serum from the control group (group A) and from *Scedosporium*-colonized patients (group C) was positive with rGST-*Sb*CatA1, whereas 5 and 15 sera were positive for *A. fumigatus*-infected patients (group B) and *Scedosporium*-infected patients (group D), respectively (Fig. 2 and Table 1). With rGST-*Sb*SODC, no serum from group C was positive, and only one and 3 for groups A and B, respectively, whereas they were 15 for group D (Table 1). All sera from groups A, B and C were negative for both rGST-*Sb*CatA1 and rGST-*Sb*SODC whereas they were 14 positive for group D (Table 1).

Performances of the test, including sensitivity, specificity, positive predictive value and negative predictive value were evaluated considering the seropositivity with each recombinant protein (Table 2). Combining the results obtained with the 2 recombinant proteins resulted in a sensitivity of 88.2% and a specificity of 97%, with a positive predictive value of 100% and a negative predictive value of 98.2% (Table 2).

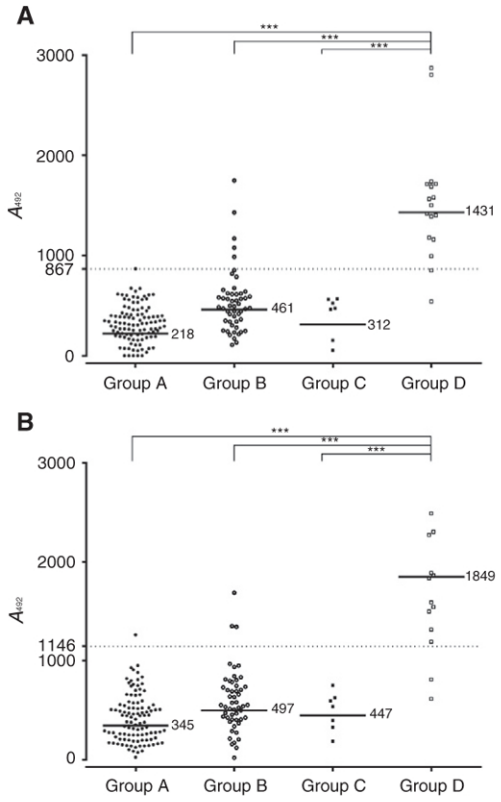


Fig. 2. Antibody response against rGST-*Sb*CatA1 (**A**) and rGST-*Sb*SODC (**B**). Antibody responses are represented by the A_{492} value obtained for each serum. Sera from group A (solid circles) correspond to CF patients without any filamentous fungus recovered from sputum samples during the 6 months preceding or following blood sampling, and without serum antibodies directed towards *A. fumigatus* and *Scedosporium* species crude antigenic extracts (n = 105); sera from group B (open circle) correspond to CF patients colonized by *A. fumigatus* and with a positive antibody response exclusively against *A. fumigatus* by standard serological tests (n = 52); sera from group C (solid squares) correspond to CF patients colonized only by *Scedosporium* species, but without antibodies directed against *Scedosporium* species by standard tests (n = 7); sera from group D (open squares) correspond to CF patients with an exclusive recovery of *Scedosporium* species from respiratory secretions and with a serological response exclusively against *Scedosporium* species antigenic extract by standard methods (n = 17). The cut-off (dotted line) and median A_{492} values (solid lines) are indicated. For the 2 recombinant proteins, the A_{492} mean value obtained for sera from patients from group D is significantly different from that obtained for each of the 3 other groups, in Wilcoxon–Mann Whitney test, with a *p*-value lower than 0.0001 (indicated by 3 asterisks).

4. Discussion

In CF, a major concern remains the differentiation of a respiratory infection from an airway colonization in case of positive mycological examination in respiratory secretions. When comparing real-time PCR detection of *A. fumigatus* DNA in sputum, sputum galactomannan detection, and determination of total serum IgE level and specific serum IgE and IgG levels, the importance of specific IgG for diagnosis of an *Aspergillus* respiratory infection was highlighted in CF patients colonized by *A. fumigatus* (Baxter et al., 2013). Colonization of the respiratory tract can be demonstrated by detection of the fungus by sputum culture or galactomannan and/or PCR. Infected patients are characterized by the presence of serum-specific anti-*A. fumigatus* IgG without specific IgE, whereas those with allergic broncho-pulmonary aspergillosis as well as sensitized patients have specific IgE antibodies with or without specific IgG, respectively.

Detection of *Scedosporium* species from respiratory secretions can be achieved by culture on semi-selective media (Sedlacek et al., 2015). Nevertheless, mycological examination does not allow the discrimination between an airway colonization and a *Scedosporium* infection. By the detection of a specific humoral response, serodiagnosis is a useful complement to mycological examination, allowing in *Scedosporium*-culture positive patients the diagnosis of an infection. This serodiagnosis currently relies on CIE using homemade crude antigenic extracts with possible batch-to-batch variations and false positive results because of cross-reactions with *A. fumigatus* (Chabasse et al., 1991; Cimon et al., 1995, 2000).

Serum anti-catalase antibodies are known since a long time to be valuable markers for serodiagnosis of *Aspergillus* infections (Sarfati et al., 2006; Tran Van Ky et al., 1968). Likewise, we demonstrated using a large panel of sera that purified *S. boydii* CatA1 allowed the differentiation between *Scedosporium* and *Aspergillus* infections (Mina et al., 2015a). Therefore, in another step towards a standardized serological test for serodiagnosis of a *Scedosporium* infection, we

Table 1
Positivity of patient sera against rGST-*Sb*CatA1 and rGST-*Sb*SODC.

	Patient sera diluted 1/800		
	rGST-*Sb*CatA1	rGST-*Sb*SODC	Seropositivity with both antigens
Group A (n = 105)	218 ± 182 (0/0%)	345 ± 242 (1/0.95%)	(0/0%)
Group B (n = 52)	461 ± 312 (5/9.6%)	497 ± 313 (3/5.8%)	(0/0%)
Group C (n = 7)	312 ± 208 (0/0%)	447 ± 19 (0/0%)	(0/0%)
Group D (n = 17)	1431 ± 591 (15/88.2%)	1849 ± 954 (15/88.2%)	(14/82.4%)

Apart from the right column, results correspond to geometric means of the obtained A_{492} values ± standard deviation. The number of positive sera and percentage of positivity are indicated for each patient group in parenthesis.

Table 2
Efficiency of the recombinant proteins rGST-*Sb*CatA1 or rGST-*Sb*SODC for serodiagnosis of a *Scedosporium* infection.

	Seropositivity using		
	rGST-*Sb*CatA1	rGST-*Sb*SODC	Both recombinant proteins
Sensitivity	88.2%	88.2%	82.4%
Specificity	97%	97.6%	100%
Positive predictive value	75%	79%	100%
Negative predictive value	99%	99%	98.2%

investigated here using mostly the same sera, the value of recombinant *S. boydii* catalase A1 for specific antibody detection in CF since recombinant proteins are easier to prepare than the native proteins. In addition, a fourth group of sera (Group C: *Scedosporium*-colonized patients) was included to evaluate the potential of this ELISA assay to discriminate between an airway colonization by *Scedosporium* species and a *Scedosporium* infection.

Among reactive oxygen species (ROS)-detoxifying enzymes, superoxide dismutases may be also of interest since 84% of the sera from patients infected by *Aspergillus* were shown to recognize a purified SOD from *A. fumigatus* (Hamilton et al., 1995, 1996). More recently, several recombinant proteins derived from *A. fumigatus* proteins, including SODC, Alp1 and DPPV, were compared for serodiagnosis of an *A. fumigatus* infection (Sarfati et al., 2006). Based on these results, 3 additional *Scedosporium* recombinant proteins (Cu,Zn-SOD, Alp1 and DDPV) were also evaluated.

Initially, in order to be close to the native glycosylated protein, recombinant CatA1 was produced in *P. pastoris* which allows glycosylation. However, the obtained protein exhibited a molecular mass 20 kDa higher than the expected mass suggesting hyper-glycosylation. Subsequently, *Scedosporium* recombinant proteins were produced in *E. coli* which led to proteins exhibiting molecular masses more consistent to the expected ones. None of the sera from CF patients with *a Scedosporium* infection (group D) reacted with r*Sb*CatA1-$(His)_6$ produced in *P. pastoris* whereas 88.2% of them were positive using rGST-*Sb*CatA1 produced in *E. coli*, suggesting that anti-catalase A1 antibodies in sera from CF patients with a *Scedosporium* infection are directed against sequential or conformational epitopes rather than glycosylated units and that these epitopes are masked in r*Sb*CatA1-$(His)_6$ by the hyper-glycosylation.

Significant differences were observed between sera from *Scedosporium*-infected CF patients (group D) and sera from the other groups, with reactivities 4 to 5 fold higher against rGST-*Sb*CatA1 and rGST-*Sb*SODC. *Scedosporium*-infected patients have developed specific antibodies against catalase A1 and this Cu,Zn-SOD, thus suggesting involvement of these enzymes in pathogenesis. These enzymes are usually involved in the degradation of ROS released by phagocytic cells. To suppress the host immune defense, genes encoding these enzymes should be highly expressed in fungal cells exposed to ROS, as demonstrated previously for *CATA1* gene (Mina et al., 2015b), thus explaining the development of a specific humoral response. Detection of these antibodies allows the differentiation between infection by *Scedosporium* species and colonization of the airways by these fungi, as none of the sera from group C was positive for the 2 recombinant proteins. Using rGST-*Sb*CatA1, sensitivity was 88.2% and specificity 97%, which is a little less than using the purified native catalase (100% sensitivity and specificity) (Mina et al., 2015a). The presence of the GST tag at the N-terminus of the recombinant protein could have an impact on the reactivity of some epitopes with patient sera. Future experiments could be performed by removing the GST tag using the enterokinase sequence introduced between the tag and the target protein sequence, which may improve further the sensitivity of our ELISA tests. Nevertheless, rGST-*Sb*CatA1 appears to be a valuable tool for the differentiation between *Scedosporium* and *Aspergillus* infections in CF. ELISA using rGST-*Sb*SODC exhibited sensitivity and specificity similar to that observed using rGST-*Sb*CatA1. Therefore, while r*Af*SODC did not appear to be suitable for serodiagnosis of aspergillosis (Sarfati et al., 2006), the recombinant Cu,Zn-SOD from *S. boydii* stands out as a potential marker.

Some cross-reactivity was observed with sera from *A. fumigatus*-infected patients (group B), as 9.6% and 5.8% of them were positive with rGST-*Sb*CatA1 and rGST-*Sb*SODC, respectively. This could be explained by some similarity in the sequence of the corresponding proteins from these 2 molds. Deduced protein sequences from catalases A genes in *A. fumigatus* (XP_748550.1) and *S. boydii* exhibit a 61% identity rate (98% coverage). Likewise, the deduced proteins from *A. fumigatus* (XP_753715.1*)* and *S. boydii SODC* genes exhibit a 75% identity rate (97% coverage). Nevertheless, combining the results obtained with rGST-*Sb*CatA1 and rGST-*Sb*SODC solves the problem of cross-reactivity as no serum from *A. fumigatus*-infected patients cross-reacted with both proteins. Search in parallel for antibodies directed against these 2 proteins would thus increase the specificity of the diagnostic test.

We would like now to evaluate prospectively this ELISA scheme using both rGST-*Sb*CatA1 and rGST-*Sb*SODC on a larger number of CF patients through a multicenter study combining clinical evaluation, blood eosinophil count and total serum IgE level measurements, mycological examination of sputum samples using a standardized procedure (Coron et al., 2017), standard serological tests for *Aspergillus* and *Scedosporium* serodiagnosis and the present ELISA assays. In addition, CF patients colonized by *A. fumigatus* (i.e. patients with recovery of *A. fumigatus* from sputum samples but without any *Scedosporium* species associated, and without serum antibodies directed towards the colonizing fungus) would be included in this study. Likewise, *Lomentospora prolificans*-culture positive patients with CF also would be investigated. Because of the low occurrence of this fungus in our center, sera from such patients were not included in the present study. Therefore, one cannot disregard some cross-reactivity between *L. prolificans* and *Scedosporium* species which are phylogenetically close. Nevertheless, this ELISA assay is not aimed to substitute to mycological examination, but to complement cultures in order to discriminate between an airway colonization and a respiratory infection. Therefore, in detecting a humoral response in *L. prolificans*-culture positive patients, such cross-reactions may be helpful for the clinicians since this fungus is also a life-threatening pathogen with very low susceptibility to all current antifungal drugs (Castanheira et al., 2012).

5. Conclusion

Our results show that *Scedosporium* recombinant proteins rGST-*Sb*CatA1 and rGST-*Sb*SODC may be useful tools for the development of a standardized serological test for serodiagnosis of *Scedosporium* infections in CF patients. Combined detection of serum specific antibodies directed against catalase A1 and the cytosolic Cu,Zn-SOD allows the differentiation between *Scedosporium* and *Aspergillus* infections, but also with an airway colonization by *Scedosporium* species, and therefore may help to set up the appropriate treatment.

Acknowledgment

This work was supported by a grant from the French association against cystic fibrosis *Vaincre la Mucoviscidose* (RF20130500840). The financial support of *Vaincre la Mucoviscidose* for Cindy Staerck's PhD thesis is gratefully acknowledged (RF20140501104).

References

Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzon A, Rodriguez-Tudela JL. Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates. Antimicrob Agents Chemother 2007;51:748–51. https://doi.org/10.1128/AAC.01177-06.

Baxter CG, Dunn G, Jones AM, Webb K, Gore R, Richardson MD, et al. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. J Allergy Clin Immunol 2013;132:560–566.e10. https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.04.007.

Biguet J, Tran Van Ky P, Fruit J. Andrieu S Identification d'une activité chymotrypsique au niveau de fractions remarquables d'*Aspergillus fumigatus*. Répercussions sur le diagnostic immunologique de l'aspergillose. Rev Immunol (Paris) 1967;31:317–28.

Blyth C, Middleton P, Harun A, Sorrell T, Meyer W, Chen S. Clinical associations and prevalence of *Scedosporium spp.* in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? Med Mycol 2010;48(Suppl. 1):S37–44. https://doi.org/10.3109/13693786.2010.500627.

Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrère J, Favennec L, Ranque S, et al. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. Med Mycol 2010;48(Suppl. 1):S88–97. https://doi.org/10.3109/13693786.2010.511287.

Castanheira M, Duncanson FP, Diekema DJ, Guarro J, Jones RN, Pfaller MA. Activities of E1210 and comparator agents tested by CLSI and EUCAST broth microdilution methods against *Fusarium* and *Scedosporium* species identified using molecular methods. Antimicrob Agents Chemother 2012;56:352–7. https://doi.org/10.1128/AAC.05414-11.

Castiglioni B, Sutton DA, Rinaldi MG, Fung J, Kusne S. *Pseudallescheria boydii* (anamorph *Scedosporium apiospermum*). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. Medicine (Baltimore) 2002;81:333–48.

Chabasse D, Bouchara JP, Chazalette JP, Carrère J, Ginies JL, de Gentile L, et al. Mucoviscidose et colonisation fongique à *Scedosporium apiospermum*. A propos de trois observations. J Mycol Méd 1991;1:152–5.

Cimon B, Carrère J, Chazalette J, Giniès J, Six P, Vinatier JF, et al. Fungal colonization and immune response to fungi in cystic fibrosis. J Mycol Méd 1995;5:211–6.

Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000;19:53–6.

Coron N, Pihet M, Fréalle E, Lemeille Y, Pinel C, Pelloux H, et al. Toward the standardization of mycological examination of sputum samples in cystic fibrosis: results from a French multicenter prospective study. Mycopathologia 2017. https://doi.org/10.1007/s11046-017-0173-1.

Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, et al. Infections caused by *Scedosporium spp.* Clin Microbiol Rev 2008;21:157–97. https://doi.org/10.1128/CMR.00039-07.

Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, et al. Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2002;40:2108–14.

Gautam P, Sundaram CS, Madan T, Gade WN, Shah A, Sirdeshmukh R, et al. Identification of novel allergens of *Aspergillus fumigatus* using immunoproteomics approach. Clin Exp Allergy 2007;37:1239–49. https://doi.org/10.1111/j.1365-2222.2007.02765.x.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. J Clin Microbiol 2005;43:4930–42. https://doi.org/10.1128/JCM.43.10.4930-4942.2005.

Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Antimicrob Agents Chemother 2006;50:4211–3. https://doi.org/10.1128/AAC.00981-06.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. J Clin Microbiol 2008;46:766–71. https://doi.org/10.1128/JCM.01122-07.

Guarro J, Kantarcioglu AS, Horré R, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, et al. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. Med Mycol 2006;44:295–327. https://doi.org/10.1080/13693780600752507.

Hamilton AJ, Holdom MD, Hay RJ. Specific recognition of purified cu,Zn superoxide dismutase from *Aspergillus fumigatus* by immune human sera. J Clin Microbiol 1995;33:495–6.

Hamilton AJ, Holdom MD, Jeavons L. Expression of the cu,Zn superoxide dismutase of *Aspergillus fumigatus* as determined by immunochemistry and immunoelectron microscopy. FEMS Immunol Med Microbiol 1996;14:95–102.

Heath C, Slavin M, Sorrell T, Handke R, Harun A, Phillips M, et al. Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. Clin Microbiol Infect 2009;15:689–93. https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02802.x.

Husain S, Muñoz P, Forrest G, Alexander BD, Somani J, Brennan K, et al. Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* in transplant recipients: clinical characteristics and impact of antifungal agent therapy on outcome. Clin Infect Dis 2005;40:89–99. https://doi.org/10.1086/426445.

Kiffer-Moreira T, Pinheiro AAS, Pinto MR, Esteves FF, Souto-Padrón T, Barreto-Bergter E, et al. Mycelial forms of *Pseudallescheria boydii* present ectophosphatase activities. Arch Microbiol 2007;188:159–66. https://doi.org/10.1007/s00203-007-0232-y.

Lackner M, Hagen F, Meis JF, Gerrits van den Ende AH, Vu D, Robert V, et al. Susceptibility and diversity in the therapy-refractory genus *Scedosporium*. Antimicrob Agents Chemother 2014a;58:5877–85. https://doi.org/10.1128/AAC.03211-14.

Lackner M, de Hoog GS, Yang L, Moreno LF, Ahmed SA, Andreas F, et al. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria*, *Scedosporium* and related genera. Fungal Divers 2014b;67:1–10. https://doi.org/10.1007/s13225-014-0295-4.

Larcher G, Cimon B, Symoens F, Tronchin G, Chabasse D, Bouchara JP. A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. Biochem J 1996;315:119–26.

Lima OC, Larcher G, Vandeputte P, Lebouil A, Chabasse D, Simoneau P, et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a cu, Zn-superoxide dismutase from *Scedosporium apiospermum*. Microbes Infect 2007;9:558–65. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2007.01.027.

Manso E, Cariani L, Fiscarelli E, Ravenni N, Iula V, De Intinis G, et al. Isolation of filamentous fungi in the sputum of cystic fibrosis patients in Italy: State of the art and epidemiology. Second meeting of the ECMM/ISHAM working group fungal respiratory infections in cystic fibrosis; 2011. [Angers, France], Oral presentation.

Mina S, Marot-Leblond A, Cimon B, Fleury MJJ, Larcher G, Bouchara J-P, et al. Purification and characterization of a mycelial catalase from *Scedosporium boydii*, a useful tool for specific antibody detection in patients with cystic fibrosis. Clin Vaccine Immunol 2015a;22:37–45. https://doi.org/10.1128/CVI.00482-14.

Mina S, Staerck C, d'Almeida SM, Marot A, Delneste Y, Calenda A, et al. Identification of *Scedosporium boydii* catalase A1 gene, a reactive oxygen species detoxification factor highly expressed in response to oxidative stress and phagocytic cells. Fungal Biol 2015b;119:1322–33. https://doi.org/10.1016/j.funbio.2015.09.007.

Morio F, Horeau-Langlard D, Gay-Andrieu F, Talarmin J-P, Haloun A, Treilhaud M, et al. Disseminated *Scedosporium/Pseudallescheria* infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol 2010;48:1978–82. https://doi.org/10.1128/JCM.01840-09.

Paugam A, Baixench M-T, Demazes-Dufeu N, Burgel P-R, Sauter E, Kanaan R, et al. Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. Med Mycol 2010;48(Suppl. 1):S32–6. https://doi.org/10.3109/13693786.2010.503665.

Pereira MM, Silva BA, Pinto MR, Barreto-Bergter E, dos Santos ALS. Proteins and peptidases from conidia and mycelia of *Scedosporium apiospermum* strain HLPB. Mycopathologia 2009;167:25–30. https://doi.org/10.1007/s11046-008-9147-7.

Piechura JE, Kurup VP, Fink JN, Calvanico NJ. Antigens of *Aspergillus fumigatus*. III. Comparative immunochemical analyses of clinically relevant aspergilli and related fungal taxa. Clin Exp Immunol 1985;59:716–24.

Pihet M, Carrere J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, et al. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis–a review. Med Mycol 2009;47:387–97. https://doi.org/10.1080/13693780802609604.

Pinto MR, Rodrigues ML, Travassos LR, Haido RMT, Wait R, Barreto-Bergter E. Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. Glycobiology 2002;12:251–60.

Rougeron A, Schuliar G, Leto J, Sitterlé E, Landry D, Bougnoux M-E, et al. Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum* species complex. Environ Microbiol 2015;17:1039–48. https://doi.org/10.1111/1462-2920.12472.

Sahi H, Avery RK, Minai OA, Hall G, Mehta AC, Raina P, et al. Scedosporium apiospermum (*Pseudallescheria boydii*) infection in lung transplant recipients. J Heart Lung Transplant 2007;26:350–6. https://doi.org/10.1016/j.healun.2007.01.011.

Sarfati J, Monod M, Recco P, Sulahian A, Pinel C, Candolfi E, et al. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. Diagn Microbiol Infect Dis 2006;55:279–91. https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2006.02.002.

Schønheyder H, Jensen T, Laessøe IH, Høiby N, Koch C. Serum antibodies to *Aspergillus fumigatus* catalase in patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1988;7:40–4.

Schwarz C, Hartl D, Eickmeier O, Hector A, Benden C, Durieu I, et al. Progress in definition, prevention and treatment of fungal infections in cystic fibrosis. Mycopathologia 2017. https://doi.org/10.1007/s11046-017-0182-0.

Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, Albert F, Peter S, Würstl B, et al. Prevalence of *Scedosporium species* and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. J Cyst Fibros 2015;14:237–41. https://doi.org/10.1016/j.jcf.2014.12.014.

Silva BA, Souza-Gonçalves AL, Pinto MR, Barreto-Bergter E, Santos ALS. Metallopeptidase inhibitors arrest vital biological processes in the fungal pathogen *Scedosporium apiospermum*. Mycoses 2011;54:105–12. https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.2009.01767.x.

Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, Denis O, Estenne M, Nolard N, et al. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. J Heart Lung Transplant 2006;25:603–7. https://doi.org/10.1016/j.healun.2005.12.011.

Tran Van Ky P, Biguet J, Vaucelle T. Study on an antigenic fraction of *Aspergillus fumigatus* supporting a catalase activity. Consequence on the immunologic diagnosis of aspergillosis. Rev Immunol Ther Antimicrob 1968;32:37–52.

Vázquez-Tsuji O, Campos Rivera T, Rondán Zárate A, Mirabal García M. Endobronchitis by *Scedosporium apiospermum* in a child with cystic fibrosis. Rev Iberoam Micol 2006;23:245–8.

Vojdani A. Cross-reactivity of *Aspergillus*, *Penicillium*, and *Stachybotrys* antigens using affinity-purified antibodies and immunoassay. Arch Environ Health 2004;59:256–65.

Ziesing S, Suerbaum S, Sedlacek L. Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. Med Mycol 2016;54:781–6. https://doi.org/10.1093/mmy/myw035.

Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara J-P, Giraud S. Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii*/*Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. Med Mycol 2013;51:603–13. https://doi.org/10.3109/13693786.2013.770606.

Discussion générale et perspectives

La mucoviscidose est la maladie génétique autosomique récessive la plus fréquente dans la population caucasienne. Cette maladie est due à des mutations du gène *CFTR* qui code une protéine transmembranaire au rôle de canal chlore. Cette protéine est retrouvée à la membrane des cellules de nombreux épithéliums, ce qui explique les atteintes multi-organes observées dans la mucoviscidose. L'atteinte pulmonaire est cependant la plus grave, puisque les infections respiratoires constituent la principale cause de morbidité et de mortalité dans cette maladie. Au niveau pulmonaire, la mucoviscidose se caractérise par un épaississement du mucus bronchique qui devient très visqueux, et une altération de la clairance mucociliaire. Ce mucus très épais permet le piégeage des bactéries et des spores fongiques inhalées et représente un environnement favorable au développement des microorganismes, qui vont coloniser les voies respiratoires et engendrer parfois des infections respiratoires chroniques. Ces colonisations/infections participent à la réaction inflammatoire excessive qui caractérise cette maladie, et conduit à une détérioration irréversible de la fonction respiratoire pouvant nécessiter à un stade avancé de la maladie une transplantation pulmonaire (Boyle et De Boeck 2013 ; Amaral 2015 ; De Boeck et Amaral 2016).

Parmi les agents infectieux rencontrés dans la mucoviscidose, les bactéries sont de loin les plus fréquents. Néanmoins les progrès réalisés ces dernières décennies dans la prise en charge des infections bactériennes ont permis une augmentation considérable de l'espérance de vie des patients (Bellis *et al*. 2016). Celle-ci s'est cependant accompagnée d'une augmentation de la fréquence des infections fongiques, avec au premier rang parmi les champignons en cause *A. fumigatus*, suivi par les espèces du genre *Scedosporium* avec une fréquence comprise entre 0,3% et 17,4% (Cimon *et al.* 1995, 2000b; Williamson *et al.* 2001; Horré et Marklein 2009; Heath *et al.* 2009; Blyth *et al.* 2010b; Paugam *et al.* 2010; Manso *et al.* 2011; Zouhair *et al.* 2013; Parize *et al.* 2014; Sedlacek *et al.* 2015; Kramer *et al.* 2015; Garczewska *et al.* 2016; Ziesing *et al.* 2016; Schwarz *et al.* 2017a).

Selon la dernière révision taxonomique, 10 espèces sont aujourd'hui reconnues dans le genre *Scedosporium* dont 5 sont rencontrées en mycologie médicale : *S. apiospermum, S. aurantiacum, S. boydii, S. dehoogii* et *S. minutisporum* (Ramirez-Garcia *et al.* 2017b). Bien que proches phylogénétiquement, ces espèces présentent des profils de résistance aux antifongiques différents, *S. aurantiacum* étant l'espèce la plus résistante aux antifongiques *in vitro* (Lackner *et al.* 2012). Un modèle murin d'infection disséminée par voie intra-veineuse chez des animaux immunocompétents a également montré des différences de virulence entre ces espèces, *S. aurantiacum* et *S. dehoogii* étant les deux espèces les plus virulentes (Gilgado *et al.* 2009). Ces champignons sont à l'origine d'une grande variété d'infections (mycétomes, colonisations/infections respiratoires, infections invasives, …), néanmoins *S. dehoogii* n'a jamais été rapporté à ce jour comme agent de colonisation des voies respiratoires ou d'infections respiratoires au cours de la mucoviscidose.

Peu de données sont connues sur ces champignons : à titre d'exemples, l'habitat naturel, ainsi que les sources de contamination des patients ne sont pas clairement établis, de même que le mode de contamination des patients. Des études sur l'écologie de ces espèces et leur distribution ont permis d'établir un lien avec la pollution liée aux activités humaines (Rougeron *et al.* 2017), et de démontrer la fréquence

relativement élevée de *S. dehoogii* dans l'environnement, notamment dans l'ouest de la France (Rougeron *et al.* 2015). Dans le contexte de la mucoviscidose, les espèces les plus fréquemment identifiées sont *S. boydii* et *S. apiospermum* (Zouhair *et al*. 2008). Peu d'études se sont intéressées aux mécanismes pathogéniques mis en jeu par ces espèces, en raison en particulier du nombre limité de données génomiques disponibles avant le séquençage complet du génome de *S. apiospermum* (Vandeputte *et al.* 2014). Depuis, trois autres génomes ont été publiés pour le genre *Scedosporium*, dont celui de *S. aurantiacum* et celui de *S. boydii* (Perez-Bercoff *et al.* 2015 ; Duvaux *et al.* 2017). La disponibilité de ces séquences permet d'envisager de nouvelles approches pour comprendre les mécanismes de pathogénicité. Bien qu'elle n'ait pas été clairement établie, la voie de contamination la plus probable serait l'inhalation de spores aéroportées par les patients atteints de mucoviscidose. Il en résulte le recrutement de cellules phagocytaires vers le foyer infectieux. L'un des mécanismes principaux de défense de l'hôte contre les pathogènes repose en effet sur les macrophages et les polynucléaires neutrophiles, et notamment sur la sécrétion des ROS et l'induction d'un stress oxydatif. Gil-Lamagnière *et al.* (2003) ont démontré que *S. boydii* induisait la production de ROS par les phagocytes. Bien que les mécanismes de résistance au stress oxydatif aient été étudiés chez un grand nombre de champignons, notamment chez *A. fumigatus, C. albicans* et *Cr. neoformans*, peu de travaux abordent cette thématique pour les *Scedosporium*. Des travaux réalisés au laboratoire chez *S. boydii* avaient permis de séquencer le gène codant une Cu/Zn-SOD cytosolique (Lima *et al.* 2007) et d'identifier 3 catalases, notamment la catalase A1 qui a été purifiée et dont le gène a été séquencé (Mina *et al.* 2015a,b).

La capacité des pathogènes à résister au stress oxydatif a été démontré comme un mécanisme clé dans la pathogénèse des infections. Face à cette absence quasi-totale de données pour les *Scedosporium,* nous nous sommes proposés d'étudier la réponse au stress oxydatif des *Scedosporium* afin de déterminer son rôle dans la pathogénicité de ce champignon, et ainsi d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.

Au niveau pulmonaire, les spores piégées dans le mucus sont exposées à une grande quantité de ROS. L'établissement d'une colonisation, puis d'une infection, nécessite la mise en place de mécanismes de résistance et/ou de protection permettant au champignon de poursuivre son développement. Dans cet objectif, nous avons recherché si les espèces du genre *Scedosporium* étaient capables de germer en condition de stress oxydatif, et s'il existait des différences inter et intra-espèces. Au cours de ce travail, nous avons pu mettre en évidence que la germination des spores de différents isolats représentant les cinq principales espèces du genre *Scedosporium* est inhibée en condition de stress oxydatif. Cette étude a cependant révélé des capacités à germer en présence d'anions superoxydes différentes entre les isolats cliniques et environnementaux, avec une plus grande sensibilité des spores des isolats cliniques face aux isolats environnementaux. Dans l'environnement, les microorganismes sont soumis à un stress oxydatif lié aux rayonnements UV, ou résultant de l'utilisation d'herbicides. Il est donc primordial pour ces espèces environnementales de se protéger vis-à-vis du stress oxydatif.

De manière surprenante, la présence d'une forte concentration en oxydant entraîne 95% d'inhibition de la germination excepté pour les isolats environnementaux de *S. apiospermum* pour lesquels

une germination résiduelle de 17% est observée, ainsi que pour un isolat de *S. dehoogii*. Il serait intéressant d'étudier l'effet du stress oxydatif sur la paroi des spores et de déterminer s'il existe des différences dans la composition biochimique de la paroi d'une espèce à l'autre, notamment dans la teneur en mélanine, puisque la mélanine intervient dans la résistance au stress oxydatif et dans la virulence (Missall *et al.* 2004). Les rétrocultures nous ont permis de montrer que les spores des *Scedosporium* restaient viables après exposition pendant 12 h à un stress oxydatif. Chez tout champignon, les spores représentent la forme de dissémination, mais aussi une forme de résistance, leur paroi est plus épaisse que celle des cellules hyphales et chez les *Scedosporium* comme pour les *Aspergillus*, la paroi est recouverte de mélanine et d'hydrophobines, qui constituent des protections supplémentaires vis-à-vis des défenses de l'hôte. Il serait donc intéressant de vérifier si en présence de cellules phagocytaires activées, les spores des *Scedosporium* sont capables de germer et d'estimer la mortalité. Afin de résister au stress oxydatif, les espèces les plus sensibles au stress oxydatif pourraient restées à l'état quiescent sous forme de spores (dans les cellules épithéliales par exemple) et germer lors d'une diminution des défenses de l'hôte, notamment lors d'une transplantation d'organes. Une étude cinétique pourrait être menée en condition de stress oxydatif par voie chimique, avec différentes concentrations d'oxydant et estimation de la mortalité après différents temps d'incubation à l'aide d'iodure de propidium et de bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium.

Les différences de sensibilité au stress oxydatif entre les isolats suggèrent un mécanisme d'adaptation. Nos travaux ont montré que les isolats cliniques de *S. aurantiacum* étaient les plus aptes à germer en condition de stress oxydatif, au contraire des isolats de *S. apiospermum*. De la même manière les isolats environnementaux de *S. aurantiacum* et *S. apiospermum* sont moins sensibles que ceux de *S. dehoogii*, espèce la plus fréquente dans l'environnement dans l'ouest de la France (Rougeron *et al.* 2015). De manière intéressante, *S. aurantiacum* est également l'espèce la plus virulente au sein du genre *Scedosporium*, mais aussi la plus résistante aux antifongiques (Gilgado *et al.* 2009; Lackner *et al.* 2012; Kaur *et al.* 2015; Mello *et al.* 2016). De même, malgré sa prédominance dans l'environnement, *S. dehoogii* n'a jamais été rapporté dans le contexte de la mucoviscidose ou d'autres maladies pulmonaires chroniques. Son absence dans les infections respiratoires à *Scedosporium* pourrait être liée à la sensibilité particulière de ses spores au stress oxydatif. La production de ROS et RNS par les phagocytes est un mécanisme clé dans la protection contre les pathogènes comme le démontre la fréquence des infections respiratoires chez les patients atteints de granulomatose chronique familiale, maladie génétique caractérisée par un défaut de production des ROS par les cellules phagocytaires (Goldblatt 2014; Buvelot *et al.* 2017).

Afin de se protéger contre le stress oxydatif et de conserver l'intégrité cellulaire, les pathogènes ont développé une grande variété de mécanismes moléculaires de nature enzymatique on non enzymatique. Les premiers font appel à une large variété d'enzymes permettant la dégradation des ROS, notamment des superoxyde dismutases (SOD) et des catalases, mais aussi les protéines des systèmes du glutathion et de la thiorédoxine (Belozerskaya & Gessler 2007; Gessler *et al.* 2007; Dantas *et al.* 2015; Staerck *et al.* 2017a,b). La dégradation des RNS met en jeu des flavohémoglobines, ainsi que des nitrate

et nitrite réductases (Lancaster *et al.* 1979; Prodouz & Garrett 1981; Hall & Tomsett 2000; Fang 2004; Belozerskaya & Gessler 2007; Gessler *et al.* 2007; Forrester *et al.* 2011; Forrester & Foster 2012; Marcos *et al.* 2016). Dans le cadre de cette thèse, nous nous sommes intéressés aux mécanismes enzymatiques mis en jeu par les *Scedosporium* en réponse au stress oxydatif.

L'étude de ces enzymes a été initiée chez *S. boydii*, espèce pour laquelle deux gènes codant une catalase et une Cu/Zn-SOD avaient été identifiés par walking-PCR. Nos premières expériences nous ont permis de mettre au point les conditions expérimentales d'induction d'un stress oxydatif par voie chimique ou par co-cultures avec les cellules phagocytaires. Dans cette étude, nous avons démontré que la catalase A1 de *S. boydii* était fortement surexprimée en réponse au stress oxydatif alors que la Cu/Zn-SOD cytosolique SodC était exprimée de manière constitutive. En l'absence de données sur le génome de ce champignon, l'étude des autres systèmes enzymatiques potentiellement impliqués dans la réponse au stress oxydatif était délicate. De ce fait, nous nous sommes ensuite tournée vers *S. apiospermum,* pour lequel le génome d'une première souche (*S. apiospermum* IHEM 14462) venait d'être séquencé grâce à un financement de l'association Vaincre la Mucoviscidose (Vandeputte *et al.* 2014). L'analyse de ce génome a permis l'identification de 31 autres gènes codant pour des protéines impliquées chez d'autres pathogènes dans la réponse au stress oxydatif. Au total, les 33 gènes identifiés se répartissent comme suit : 4 Cu/Zn-SODs, 3 Mn-SODs, 4 catalases, 10 protéines du système du glutathion et 6 du système de la thiorédoxine, 2 peroxydases, 2 flavohémoglobines, une nitrate réductase et une nitrite réductase. Nous avons ensuite étudié leur expression en condition de stress oxydatif chimique et en co-culture avec des cellules phagocytaires. Nous avons optimisé l'extraction des ARN, en utilisant le Kit *NucleoSpin® RNA Plant* qui permet une standardisation du protocole d'extraction, un meilleur rendement d'extraction et une meilleure qualité des ARN extraits. Nous avons également adapté les temps de co-culture pour *S. apiospermum.* Les résultats obtenus montrent une différence entre *S. apiospermum* et *S. boydii* dans le niveau d''expression du gène *CATA1.* En effet, le gène *CATA1* est surexprimé chez *S. apiospermum* uniquement en présence de peroxyde d'hydrogène à concentration de 2 mM, alors que chez *S. boydii* il est surexprimé également en présence de ménadione ainsi qu'en co-cultures avec des macrophages activés comme avec des neutrophiles activés. Avec la disponibilité des génomes d'autres espèces et de différents isolats de *Scedosporium*, une étude comparative pourrait être menée afin de déterminer s'il existe une variabilité inter-espèces et intra-espèces dans la réponse au stress oxydatif. La comparaison des profils transcriptomiques entre les différences espèces permettrait de vérifier notre hypothèse selon laquelle l'incapacité de *S. dehoogii* à engendrer une colonisation des voies respiratoires et une infection pulmonaire est liée à une sensibilité particulière au stress oxydatif.

Dans cette étude transcriptomique, nous avons pu observer que dans nos conditions de culture, certains gènes n'étaient jamais surexprimés. Les données bibliographiques montrent que certaines familles d'enzymes ciblent les même ROS. De plus, plusieurs gènes codent pour des protéines d'une même famille. Cette redondance fonctionnelle pourrait expliquer l'absence de réponse de certains des gènes étudiés. De plus, ces gènes pourraient être exprimés de manière constitutive. Enfin, il est possible que certains de ces

gènes soient exprimés dans d'autres stades morphologiques du champignon, nos expériences ayant été menées sur des hyphes. Pour compléter ce travail, l'expression de ces gènes pourrait être étudiée sur des spores de *S. apiospermum* soumises à un stress oxydatif, après optimisation du protocole d'extraction des ARN à partir de spores, mais aussi sur des filaments mycéliens. La durée d'exposition au stress oxydatif pourrait également être modulée, afin d'établir une « cartographie » de l'expression de ces gènes.

Notre étude a montré que chez *S. apiospermum,*alors que 6 des 10 gènes codant des protéines du système du glutathion étaient surexprimés en condition de stress oxydatif chimique, un seul l'était en co-cultures avec des cellules phagocytaires :le gène *SAPIO_CDS4931* qui est surexprimé en présence de neutrophiles HL60 activés. A l'inverse, 4 des 5 gènes codant des protéines du système de la thiorédoxine sont surexprimés dans les conditions de stress oxydatif étudiées. Ces deux systèmes ont des cibles communes ; cette redondance fonctionnelle peut expliquer l'absence de réponse observée pour les gènes du système du glutathion. Il serait néanmoins intéressant d'étudier l'expression de ces gènes dans des co-cultures avec des cellules phagocytaires en présence d'inhibiteurs du système de la thiorédoxine.

Toutes nos expériences ont été conduites *in vitro.* Compte tenu des discordances parfois signalées avec les résultats obtenus *in vivo* (Skamnioti *et al.* 2007), nos résultats devraient être confirmés par l'étude de l'expression de ces mêmes gènes dans un modèle expérimental d'infection à *Scedosporium* chez l'animal immunocompétent. Parallèlement, l'expression de ces gènes pourrait être analysée dans des co-cultures avec différents types cellulaires, comme les sous-populations de macrophages pro-inflammatoires (dits de type M1) et anti-inflammatoires (dits de type M2). De plus, une comparaison pourrait être envisagée avec des cellules de phénotype $CFTR^{-/-}$.

Nos travaux ont démontré également l'importance de 4 gènes, codant une catalase et trois protéines appartenant au système de la thiorédoxine (une peroxyrédoxine et deux thiorédoxine réductases). Ces gènes sont fortement surexprimés dans nos conditions expérimentales, en particulier les gènes *SaPRX2* et *SAPIO_CDS1830* qui sont surexprimés dans toutes les conditions étudiées. Les différentes études publiées sur les catalases ont produit des résultats relativement décevants quant à leur rôle dans la virulence, peut-être du fait de la redondance fonctionnelle. Aussi nous avons concentré nos efforts sur le système de la thiorédoxine.

Bien que peu étudiées, les thiorédoxine réductases ont été démontrées comme participant à la virulence chez certains microorganismes (Fernandez & Wilson 2014; Viefhues *et al.* 2014), ou comme essentielles à la viabilité chez d'autres pathogènes (Krnajski *et al.* 2002; Uziel *et al.* 2004; Missall & Lodge 2005; Zhang *et al.* 2016). Une utilisation de la thiorédoxine réductase de *C. albicans* à des fins vaccinales a récemment été proposée par Godoy *et al.* (2015). Enfin, des inhibiteurs des thiorédoxine réductases ont montré une activité antimicrobienne sur une large gamme de microorganismes (Tejman-Yarden *et al.* 2013; Fuchs *et al.* 2016). Afin d'appréhender le rôle de ces thiorédoxine réductases chez *S. apiospermum,* nous avons tenté de produire des mutants pour ces gènes. Bien que des mutants ont été obtenus avec

succès chez *Beauveria bassiana* (Zhang *et al.* 2016), *Botrytis cinerea* (Viefhues *et al.* 2014), *Saccharomyces cerevisiae* (Machado *et al.* 1997; Pedrajas *et al.* 1999) et *Schizosaccharomyces pombe* (Park *et al.* 2012), nos tentatives se sont soldées par un échec. Les investigations doivent être poursuivies afin de déterminer le rôle de ces protéines dans la pathogénicité de *Scedosporium*. Dans nos travaux, nous avons été limitée par les quantités de cassettes de délétion obtenues par PCR fusion, comme par la quantité de protoplastes générés. Les dernières expériences menées au laboratoire ont montré une augmentation du nombre de protoplastes obtenus à partir de filaments mycéliens âgés de 30 à 40 h comparativement au nombre de protoplastes obtenus à partir de tubes germinatifs âgés d'une quinzaine d'heures. Pour augmenter les quantités de cassettes de délétion disponibles, celles-ci pourraient être clonées dans un vecteur d'expression (plasmide pGEMT par exemple). D'autres stratégies peuvent également être envisagées. L'une d'elles consisterait à remplacer le promoteur de ce gène par un promoteur faible ou inductible. Une autre approche que nous avons initiée repose sur l'utilisation d'inhibiteurs des thiorédoxine réductases.

Ainsi, parallèlement à nos essais d'invalidation des gènes codant les thiorédoxine réductases, nous avons évalué l'activité antifongique d'inhibiteurs des thiorédoxine réductases. Peu d'antifongiques présentent une activité contre les espèces du genre *Scedosporium*. Ces champignons sont notamment résistants à l'amphotéricine B (Lackner *et al.* 2012). Le voriconazole et le posaconazole sont efficaces *in vitro* et *in vivo* (Capilla et Guarro 2004; Guarro *et al.* 2006; Gilgado *et al.* 2006; Espinel-Ingroff *et al.* 2008; Troke *et al.* 2008; Lackner *et al.* 2012; Lelièvre *et al.* 2013; Martin-Vicente *et al.* 2017), mais des cas de résistance sont décrits dans la littérature (Espinel-Ingroff *et al.* 2008; Troke *et al.* 2008; Homa *et al.* 2015; Martin-Vicente *et al.* 2017). Le développement de nouveaux antifongiques et l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques revêtent donc une importance particulière dans la lutte contre ces microorganismes. Dans ce cadre, les thiorédoxine réductases de *S. apiospermum* qui sont particulièrement surexprimées en réponse à différents stress oxydatifs, pourraient constituer une cible de choix. Nous avons donc évalué l'activité de l'auranofin et de l'ébselen, deux inhibiteurs des thiorédoxine réductases qui ont montré une activité antimicrobienne sur une large gamme de microorganismes. Selon Wiederhold *et al.* (2017b), l'auranofin exerce une faible activité antifongique vis-à-vis des *Scedosporium.* Nos résultats sont en accord avec cette étude, puisque des CI_{50} allant de 1 à 8 µg/mL selon les isolats et les espèces ont été obtenues. Il n'y a pas de différence significative entre les isolats cliniques et les isolats environnementaux, ainsi qu'entre les différentes espèces. Des études complémentaires visant à évaluer l'activité de ces inhibiteurs vis-à-vis des *Scedosporium* en présence d'un stress oxydatif, induit par voie chimique par exemple, pourraient être réalisées. L'ebsélen est également actif contre de nombreux microorganismes, mais ne présente pas d'activité anti-*Scedosporium.* D'autres analogues ont été synthétisés, comme l'ebsulfure qui présente une activité antifongique plus importante que l'ebsélen (Ngo *et al.* 2016a). Il conviendrait donc à l'avenir de tester des analogues de l'ebsélen. Nos travaux ont été menés sur des spores de *Scedosporium*, or la sensibilité aux antifongiques peut varier avec le stade morphologique du champignon (Mello *et al.* 2016). Nos expériences devront donc reproduites sur des tubes germinatifs.

Les expériences que nous avons menées sur la souche de référence de *S. apiospermum* ont montré que l'auranofin présente un effet additif avec le voriconazole et le posaconazole. Pour confirmer ces résultats, de nouvelles expériences devront être menées sur d'autres isolats et espèces de *Scedosporium.* Par ailleurs, il est établi que la corrélation *in vitro* et *in vivo* est généralement faible, comme cela a été démontré par exemple pour les associations de voriconazole ou de posaconazole avec la micafungine (Lackner *et al.* 2014a). Il est donc important de compléter nos expériences par une étude *in vivo* pour confirmer ces résultats. Des associations d'antifongiques conventionnels avec d'autres inhibiteurs d'enzymes du stress oxydatif pourraient être évaluées.

Les espèces du genre *Scedosporium* sont résistantes à l'amphotéricine B. Cet antifongique induit un stress oxydatif (Sokol-Anderson *et al.* 1986, 1988, González-Párraga *et al.* 2003, 2011; Phillips *et al.* 2003; Sangalli-Leite *et al.* 2011; Mesa-Arango *et al.* 2014; Blatzer *et al.* 2015; Román *et al.* 2016; Guirao-Abad *et al.* 2017) et certains champignons utiliseraient leur système antioxydant, notamment des catalases et des Mn-SODs, afin de contrer ce stress oxydatif (Sokol-Anderson *et al.* 1986, 1988; González-Párraga *et al.* 2011; Mesa-Arango *et al.* 2014; Guirao-Abad *et al.* 2017). Des études ont démontré que la résistance à l'amphotéricine B était corrélée à une forte expression de la catalase, associée à une diminution de la production de ROS (Kim *et al.* 2012a; Blum *et al.* 2013; Vincent *et al.* 2013; Linares *et al.* 2013; Mesa-Arango *et al.* 2014; Blatzer *et al.* 2015). Afin d'identifier si la réponse au stress oxydatif chez *Scedosporium* est impliquée dans la résistance à l'amphotéricine B, l'effet du 2,3 dihydroxybenzaldéhyde (connu pour interférer dans la réponse au stress oxydatif) pourrait être évalué en présence d'amphotéricine B, comme dans l'étude de Kim *et al.* (2012b).

Dans cette thèse, nous nous sommes également intéressés à deux autres gènes, codant une Cu/Zn-SOD (*SAPIO_CDS3212*) et le facteur de transcription *Sa*Yap1 (*SAPIO_CDS9352)*. Le facteur de transcription AP-1 ou Yap1 a été identifié chez un grand nombre de champignons comme participant à la réponse au stress oxydatif, en régulant l'expression des gènes codant des enzymes impliquées dans la réponse au stress oxydatif, ainsi que des gènes impliqués dans la biosynthèse d'antioxydants non enzymatiques (Lee *et al.* 1999; Gasch *et al.* 2000; Dumond *et al.* 2000; Molina et Kahmann 2007; Temme et Tudzynski 2009; Reverberi *et al.* 2012; Montibus *et al.* 2013; Dankai *et al.* 2016; Sun *et al.* 2016; Chen *et al.* 2017). Ce facteur de transcription est également impliqué dans la réponse aux antifongiques chez *A. fumigatus, C. albicans, Cr. neoformans, S. cerevisiae* et *S. pombe* (Toone *et al.* 1998; Alarco et Raymond 1999; Qiao *et al.* 2010; Paul *et al.* 2015). De la même manière, le facteur de transcription *Sa*Yap1 pourrait être impliqué chez *Scedosporium* dans la régulation des mécanismes enzymatiques et non enzymatiques de détoxification des ROS mais également dans la résistance aux antifongiques. Le rôle de ces facteurs de transcription dans la virulence est discuté et semble dépendre de l'espèce étudiée (Lev *et al.* 2005; Lessing *et al.* 2007; Molina et Kahmann 2007; Qiao *et al.* 2008; Yang *et al.* 2009; Jain *et al.* 2009; Lin *et al.* 2009; Temme et Tudzynski 2009; Guo *et al.* 2011; Lin *et al.* 2011; Chung 2012; Montibus *et al.* 2013; Jain *et al.* 2013; Cartwright et Scott 2013; Gamboa-Meléndez *et al.* 2013; Dai *et al.* 2013; Patterson *et al.* 2013; Komalapriya *et al.* 2015; Yang *et al.* 2015; Kos *et al.* 2016; Sun *et al.* 2016; Li *et al.* 2017; Yu *et al.* 2017).

Ces facteurs de transcription seraient sous la dépendance des anions superoxydes et du peroxyde d'hydrogène, puisque la virulence de mutants défectifs pour le gène YAP1 chez *A. alternata* peut être restauré en présence d'inhibiteurs de la NADPH oxydase (Molina et Kahmann 2007; Yang *et al.* 2009; Chung 2012).

Dans le génome de la souche *S. apiospermum* IHEM 14462, nous avons identifié un orthologue du gène *YAP1* homologue d'*A. fumigatus* codant le facteur de transcription régulant l'expression de nombreux gènes impliqués dans la dégradation des ROS/RNS. Des orthologues sont également présents dans le génome des autres isolats et/ou espèces : *S. apiospermum* HDO, *S. aurantiacum WM 09.24* et *S. boydii* IHEM 23826. Un transformant a été obtenu, issu cependant d'une recombinaison illégitime en dépit de l'utilisation d'une souche parentale invalidée sur le gène *Ku70*, puisque ce transformant possède à la fois la cassette de délétion et le gène sauvage codant la protéine *Sa*Yap1. Ce résultat peut suggérer un caractère diploïde avec invalidation d'un seul des allèles. Actuellement, nous n'avons pas de certitude sur le caractère haploïde ou diploïde de *S. apiospermum*. Néanmoins, l'obtention de mutants invalidés sur le gène *Ku70* ou comme dans cette thèse sur le gène codant la Cu/Zn-SOD à ancre GPI est en faveur d'un caractère haploïde. D'autres tentatives de transformation sont nécessaires pour invalider le gène *SaYAP1* afin de préciser le rôle de ce facteur de transcription dans la pathogénicité des *Scedosporium.* Cette protéine pourrait être un acteur clé de la réponse au stress oxydatif chez les *Scedosporium* et de la virulence de ces champignons. Dans un second temps, il serait intéressant de comprendre les mécanismes de régulation de ce facteur de transcription. Chez *C. albicans,* il a été démontré qu'une glutathion peroxydase Gpx3 et une protéine impliquée dans la fixation de Yap1 (Ypb1) intervenaient dans la régulation de l'expression de *YAP1* (Patterson *et al.* 2013).

Les superoxydes dismutases sont impliquées dans la réponse au stress oxydatif chez un grand nombre de pathogènes (Desai *et al.* 1995; Hamilton *et al.* 1996; Hwang *et al.* 1999, 2002 ; Narasipura *et al*. 2003 ; Martchenko *et al.* 2004 ; Rolke *et al.* 2004 ; Fradin *et al*. 2005 ; Park *et al.* 2005 ; Thirach *et al.* 2007 ; Abbà *et al.* 2009 *;* Frohner *et al.* 2009; Lambou *et al.* 2010 ; Miramon *et al.* 2012 ; Youseff *et al.* 2012 ; Gleason *et al.* 2014 ; Garfoot et Rappleye 2016 ; Tamayo *et al.* 2016 *;* López-Cruz *et al.* 2017). Nos travaux ont permis l'obtention d'un mutant pour le gène *SAPIO_CDS3212* codant une Cu/Zn-SOD. Les analyses phénotypiques préliminaires ont montré que ce mutant présentait un retard de croissance par rapport à la souche parentale et qu'il était sensible aux anions superoxydes. Afin de compléter ces données, il pourrait être envisagé d'évaluer la sensibilité du mutant à différents oxydants chimiques, et son devenir en présence de cellules phagocytaires. Notre analyse du génome de *S. apiospermum* indique la présence de 3 autres gènes codant des Cu/Zn-SODs, dont 2 sont surexprimés dans les tubes germinatifs exposés à la ménadione (*SAPIO_CDS2117* et *SAPIO_CDS*4327). Le gène *SAPIO_CDS4327* est également surexprimé après une coculture avec des neutrophiles HL60 activés. Des compensations entre ces différentes SODs pourraient expliquer en quoi la délétion du gène *SAPIO_CDS3212* entraîne une diminution de la croissance lors d'un stress oxydatif et non une inhibition totale. L'étude de l'expression de ces trois autres gènes chez le mutant exposé à un stress oxydatif permettrait d'explorer cette hypothèse.

Les SODs participent chez *C. albicans* à la résistance vis-à-vis de certains antifongiques (Sokol-Anderson *et al.* 1986; González-Párraga *et al.* 2011; Bink *et al.* 2011; De Brucker *et al.* 2013; De Cremer *et al.* 2016). La sensibilité est restaurée lorsque l'activité des SODs est inhibée (Bink *et al.* 2011; De Brucker *et al.* 2013). Le rôle de ces enzymes dans la virulence a également été exploré pour différentes espèces fongiques. Chez *A. fumigatus,* trois gènes *SOD* sont connus, un triple mutant *ΔSod1/ΔSod2/ΔSod3* a été généré, sans modification de la virulence comparé à la souche parentale (Lambou *et al.* 2010). A l'inverse, la délétion du gène S*od1* de *B. cinerea* (Rolke *et al.* 2004; López-Cruz *et al.* 2017), des gènes *Sod1* et *Sod5* de *C. albicans* (Hwang *et al.* 2002; Martchenko *et al.* 2004; Chaves et Silva 2012; Dantas *et al.* 2015), du gène *Sod1* de *Cr. neoformans* (Narasipura *et al.* 2003, 2005) ou encore du gène *Sod3* de *P. brasiliensis* (Tamayo *et al.* 2016) se traduit par une diminution de la virulence.

Le gène que nous avons délété, code une Cu/Zn-SOD ancrée dans la paroi par un groupement glycosylphosphatidylinositol (GPI). Cette protéine est donc localisée en surface des cellules fongiques ; par ailleurs, l'analyse comparative des protéines à ancre GPI présentes en surface des spores ou des tubes germinatifs de *S. boydii* a montré que cette Cu/Zn-SOD à ancre GPI est spécifique des spores (Ghamrawi *et al.* 2015). Le rôle de cette protéine dans la virulence devra être exploré en priorité. La contamination des patients s'effectuant vraisemblablement par inhalation de spores, celles-ci doivent impérativement échapper aux systèmes de défense de l'hôte, et cette protéine pariétale pourrait donc jouer un rôle majeur. Afin de préciser le rôle de cette protéine, la virulence du mutant devra être évaluée, par comparaison avec la souche sauvage et le mutant Ku70, dans un modèle expérimental d'infection disséminée utilisant des animaux immunocompétents, tel que celui développé dans le laboratoire par Lelièvre *et al.* (2013).

Au cours de cette thèse, nous nous sommes également intéressés au diagnostic biologique des infections à *Scedosporium,* notamment les infections respiratoires au cours de la mucoviscidose. Le diagnostic biologique de ces infections repose sur la mise en culture des sécrétions respiratoires, principalement des expectorations, sur des milieux semi-sélectifs limitant notamment la croissance d'*A. fumigatus*, et sur l'identification des colonies obtenus sur les critères morphologiques (macroscopique et microscopique) pour la reconnaissance du genre *Scedosporium*, puis sur des méthodes de biologie moléculaire classiques (séquençage du locus TUB du gène de la beta-tubuline), ou biochimiques (spectrométrie de masse de type MALDI-TOF) (Gilgado *et al.* 2006 ; Sitterlé *et al.* 2014) pour l'identification précise de l'espèce en cause. Toutefois, ces méthodes ne permettent pas de distinguer la colonisation et l'infection. Seule la détection d'anticorps sériques permet cette différenciation. Aujourd'hui, la méthode sérologique de référence est l'électrosynérèse utilisant des extraits antigéniques bruts de *S. apiospermum* ou *S. boydii*. Cette technique manque de reproductibilité compte tenu des extraits antigéniques utilisés ; par ailleurs, il existe des réactions croisées avec d'autres champignons filamenteux comme les *Aspergillus* (Cimon *et al.* 2000b). Enfin, cette recherche d'anticorps sériques n'est réalisée que par un nombre restreint de laboratoires, compte tenu de l'absence de commercialisation des extraits antigéniques. Pour une meilleure prise en charge des patients, il est essentiel de développer des techniques permettant la distinction entre colonisation et infection à *Scedosporium.* Dans ce but, nous avons développé un test

ELISA parfaitement standardisable et qui pourrait donc être plus largement utilisé. Nous avons produit 5 protéines recombinantes à partir de gènes codant des protéines ayant montré un intérêt pour le sérodiagnostic d'autres infections fongiques (Tran Van Ky *et al.* 1968; Hamilton *et al.* 1995, 1996; Calera *et al.* 1997; Sarfati *et al.* 2006) : rGST-*Sb*CatA1, rGST-*Sb*SODC, rGST-*Sa*Alp1, rGST-*Sa*DDPV en modèle *E. coli,* et la protéine r*Sb*CatA1-$(His)_6$ en modèle *P. pastoris.* Ces protéines ont été décrites chez *Scedosporium* comme pouvant participer à la pathogénicité, en participant à la protection du champignon vis-à-vis du stress oxydatif (Lima *et al.* 2007; Mina *et al.* 2015b,a), ou dans l'invasion tissulaire (Larcher *et al.* 1996). Deux protéines recombinantes ont produit des résultats prometteurs : rGST-*Sb*CatA1, rGST-*Sb*SODC. L'utilisation conjointe de ces deux protéines permet de limiter les réactions croisées. La spécificité du test ELISA est de 100% et sa sensibilité de 88,2%. La sensibilité de ce test pourrait être augmentée en clivant les protéines rGST-*Sb*CatA1 et rGST-*Sb*SODC entre le tag GST et la protéine, afin d'augmenter la reconnaissance de ces protéines par les anticorps sériques. Fort de ces résultats, nous avons initié la production de protéines recombinantes correspondant à la catalase A1 et à la Cu/Zn-SOD d'*E. dermatitidis*, toutes deux homologues à celle de *S. apiospermum,* pour le sérodiagnostic des infections à *E. dermatitidis.* Cette technique pourrait également être envisagée pour le développement de tests de sérodiagnostic d'espèces fongiques émergentes dans la mucoviscidose comme les espèces du complexe *R. argillacea.* Si les deux protéines recombinantes rGST-*Sb*CatA1 et rGST-*Sb*SODC que nous avons produites, sont des outils prometteurs pour le sérodiagnostic à *Scedosporium*, permettant notamment de différentier les colonisations des infections à *Scedosporium* mais aussi de les différencier des infections à *A. fumigatus,* cette technique ELISA ne peut se substituer aux méthodes classiques d'identification des agents fongiques responsables de colonisation des voies respiratoires et devra être réalisée seulement en seconde intention afin de différentier la colonisation de l'infection chez les patients colonisés par *Scedosporium.* Cette technique simple, rapide et standardisée permettra ainsi une prise en charge adaptée des patients infectés.

Les deux protéines utilisées pour le développement de ce test de sérodiagnostic sont toutes deux impliquées dans la réponse au stress oxydatif chez *Scedosporium.* D'autres protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif peuvent être utilisées dans le sérodiagnostic. C'est le cas pour *A. fumigatus* de la Sod3 aussi appelée Aspf6 contre laquelle des anticorps sériques peuvent être détectés chez les patients atteints de manifestations allergiques (Crameri *et al.* 1996), notamment d'ABPA (Hemmann *et al.* 1999; Kurup *et al.* 2000). L'allergène Aspf3 qui correspond à une peroxyrédoxine est également un antigène majeur pour le sérodiagnostic des infections à *Aspergillus*, bien qu'il ne permette pas de distinction entre les patients sensibilisés par *A. fumigatus* et ceux présentant une ABPA (Hemmann *et al.* 1997, 1998; Kurup *et al.* 2000; Asif *et al.* 2010). Par ailleurs, Pellon *et al.* (2014) ont démontré qu'il existait chez les patients infectés par *L. prolificans* des IgA salivaires dirigés contre une catalase et une superoxyde dismutase (Pellon *et al.* 2014). Quant aux thiorédoxines, elles ne sont pas de bons marqueurs diagnostiques puisque des réactions croisées ont été démontrées avec les thiorédoxine humaines (Glaser *et al.* 2008). Par contre, la thiorédoxine réductase GliT d'*A. fumigatus* est un marqueur d'infection invasive à *A. fumigatus* (Singh *et al.* 2010; Kumar *et al.* 2011; Shi *et al.* 2012a,b). Les protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif sont donc des marqueurs de choix pour le sérodiagnostic. Chez *S. apiospermum,* 4 gènes se sont

révélés surexprimés dans notre étude sur la réponse au stress oxydatif, montrant que ces protéines seraient impliquées dans la pathogénicité de *S. apiospermum*. Les patients infectés par *Scedosporium* pourraient avoir développés des anticorps contre ces protéines. Afin d'améliorer la sensibilité de notre test ELISA, des protéines recombinantes dérivées des gènes codant ces protéines seront produites et leur intérêt diagnostique sera évalué. Différentes combinaisons de protéines recombinantes pourraient ainsi être exploitées afin d'augmenter la sensibilité et préciser la nature de l'infection.

Conclusion

Les travaux menés au cours de cette thèse ont permis d'appréhender certains des mécanismes mis en jeu par les *Scedosporium* pour se protéger du stress oxydatif. Les spores des *Scedosporium* présentent des profils de sensibilité variables : les spores issues d'isolats cliniques sont plus sensibles au stress oxydatif et *Scedosporium dehoogii* est l'espèce la plus sensible. La sensibilité particulière des spores de *S. dehoogii* au stress oxydatif pourrait expliquer l'incapacité de cette espèce à s'établir dans les voies respiratoires des patients. Les enzymes antioxydantes pourraient être impliquées dans l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte, et ainsi dans la colonisation des voies respiratoires et la virulence.

33 gènes codant pour des protéines potentiellement impliquées dans la protection vis-à-vis du stress oxydatif ont été identifiés chez *Scedosporium* : 4 Cu/Zn-SODs, 3 Mn-SODs, 4 catalases, 10 enzymes du système du glutathion, 6 du système de la thiorédoxine, 2 peroxydases, 2 flavohémoglobines, une nitrate réductase et une nitrite réductase. Précédemment deux Cu/Zn-SODs et 3 catalases avaient été identifiées chez *S. boydii*. L'étude de l'expression de ces gènes indique que chez *S. boydii* la catalase A1 était surexprimée en conditions de stress oxydatif, signe qu'elle participe à la détoxification des ROS et qu'elle représenterait un facteur de pathogénicité. L'étude de l'expression des 33 gènes que nous avons identifiés chez *S. apiospermum,* dans des conditions de stress oxydatif induit par voie chimique ou en co-culture avec des cellules phagocytaires, démontre l'importance d'une catalase, différente de celle précédemment étudiée chez *S. boydii,* mais aussi de 3 gènes du système thiorédoxine (1 peroxyrédoxine et 2 thiorédoxine réductases). Ces protéines pourraient représenter également des facteurs de pathogénicité. Afin de valider leurs rôles dans les mécanismes pathogéniques des mutants défectifs pour ces gènes devront être produits. Un gène codant une Cu/Zn-SOD présentant une ancre GPi, et donc localisée dans la paroi fongique, et spécifiquement exprimée en surface des spores, a été délété. Cette protéine n'est pas essentielle à la croissance. Néanmoins, l'invalidation de ce gène se traduit par une augmentation marquée du temps de latence en présence de ménadione. des expériences complémentaires devront être réalisées pour préciser le rôle de cette protéine dans la pathogénicité.

Les thiorédoxine réductases ont été identifiées comme particulièrement surexprimées dans la réponse au stress oxydatif. Là aussi, des mutants pour ces gènes devront être préparés, ce qui nécessitera des modifications du protocole de transformation. L'utilisation de l'auranofin, un inhibiteur des thiorédoxine réductases, a permis de démontrer qu'il présente une faible activité antifongique vis-à-vis des *Scedosporium* et un effet additif a été observé pour des associations d'auranofin avec le voriconazole et le posaconazole. Ces données seront vérifiées sur d'autres isolats et espèces du genre *Scedosporium.*

Les protéines participant à la réponse au stress oxydatif peuvent être utilisées en sérodiagnostic. Deux protéines recombinantes ont été produites, GST-*Sb.*CatA1 et la GST-*Sb.*SODC. Ces protéines ont permis le développement d'un test ELISA permettant le diagnostic sérologique des infections à *Scedosporium* et la différenciation d'avec les colonisations des voies respiratoires par *Scedosporium,* et les infections à *A. fumigatus.* Comparé à la technique actuellement utilisée, l'électrosynérèse, ces protéines recombinantes permettent une plus grande spécificité et surtout une standardisation de la technique. Dans un objectif d'amélioration de la sensibilité et de la spécificité des techniques sérologiques, des protéines

recombinantes dérivées d'autres protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif pourraient être évaluées.

De plus amples études sur *Scedosporium* sont nécessaires pour comprendre les mécanismes impliqués dans la réponse au stress oxydatif et le lien avec la virulence et la résistance aux antifongiques. Les études devront être poursuivies afin de confirmer si les protéines impliquées dans la réponse au stress oxydatif peuvent être des cibles thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge des patients colonisés/infectés par *Scedosporium*. Par ailleurs, l'attention devra également être portée sur les systèmes antioxydants non enzymatiques des *Scedosporium*, comme la mélanine de la paroi sporale ou les dérivés de type dithiodioxopipérazine, comme les dérivés de la gliotoxine et de l'aranotine.

Bibliographie

Abbà S, Khouja HR, Martino E, Archer DB, Perotto S, 2009. SOD1-targeted gene disruption in the ericoid mycorrhizal fungus *Oidiodendron maius* reduces conidiation and the capacity for mycorrhization. *Molecular plant-microbe interactions* **22**: 1412–1421.

Agatha D, Krishnan KU, Dillirani V, Selvi R, 2014. Invasive lung infection by *Scedosporium apiospermum* in an immunocompetent individual. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* **57**: 635–637.

Aguinagalde L, Díez-Martínez R, Yuste J, Royo I, Gil C, Lasa Í, Martín-Fontecha M, Marín-Ramos NI, Ardanuy C, Liñares J, García P, García E, Sánchez-Puelles JM, 2015. Auranofin efficacy against MDR *Streptococcus pneumoniae* and *Staphylococcus aureus* infections. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **70**: 2608–2617.

Aho R, Hirn J, 1981. A survey of fungi and some indicator bacteria in chlorinated water of indoor public swimming pools. *Zentralblatt Fur Bakteriologie, Mikrobiologie Und Hygiene. 1. Abt. Originale B, Hygiene* **173**: 242–249.

Ajello L, 1952. The isolation of *Allieschería boydii* shear, an etiologic agent of mycetomas, from soil. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **1**: 227–238.

Alarco AM, Raymond M, 1999. The b*Zip* transcription factor Cap1p is involved in multidrug resistance and oxidative stress response in *Candida albicans*. *Journal of Bacteriology* **181**: 700–708.

Al-Badriyeh D, Leung L, Davies GE, Stewart K, Kong D, 2009. Successful salvage treatment of *Scedosporium apiospermum* keratitis with topical voriconazole after failure of natamycin. *The Annals of Pharmacotherapy* **43**: 1139–1142.

Alger HM, Williams DL, 2002. The disulfide redox system of *Schistosoma mansoni* and the importance of a multifunctional enzyme, thioredoxin glutathione reductase. *Molecular and Biochemical Parasitology* **121**: 129–139.

Allain AV, Hoang VT, Lasker GF, Pankey EA, Murthy SN, Kadowitz PJ, 2011. Role of nitric oxide in developmental biology in plants, bacteria, and man. *Current topics in pharmacology* **15**: 25–33.

Alton EWFW, Boyd AC, Porteous DJ, Davies G, Davies JC, Griesenbach U, Higgins TE, Gill DR, Hyde SC, Innes JA, UK Cystic Fibrosis Gene Therapy Consortium *, 2015. A phase I/IIa safety and efficacy study of nebulized liposome-mediated gene therapy for Cystic Fibrosis supports a multidose trial. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **192**: 1389–1392.

Alvarez E, Sanhueza C, 2016. New record of *Scedosporium dehoogii* from Chile: Phylogeny and susceptibility profiles to classic and novel putative antifungal agents. *Revista Iberoamericana De Micologia* **33**: 224–229.

Amaral MD, 2015. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. *Journal of Internal Medicine* **277**: 155–166.

Amin MU, Khurram M, Khattak B, Khan J, 2015. Antibiotic additive and synergistic action of rutin, morin and quercetin against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **12**(15):59.

Andrade RM, Chaparro JD, Capparelli E, Reed SL, 2014. Auranofin is highly efficacious against *Toxoplasma gondii* in vitro and in an in vivo experimental model of acute toxoplasmosis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**: e2973.

Andrade RM, Reed SL, 2015. New drug target in protozoan parasites: the role of thioredoxin reductase. *Frontiers in Microbiology* **6**: 975

Angelucci F, Miele AE, Boumis G, Brunori M, Dimastrogiovanni D, Bellelli A, 2011. Macromolecular bases of antischistosomal therapy. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **11**: 2012–2028.

Angelucci F, Sayed AA, Williams DL, Boumis G, Brunori M, Dimastrogiovanni D, Miele AE, Pauly F, Bellelli A, 2009. Inhibition of *Schistosoma mansoni* thioredoxin-glutathione reductase by auranofin: structural and kinetic aspects. *The Journal of Biological Chemistry* **284**: 28977–28985.

April TM, Abbott SP, Foght JM, Currah RS, 1998. Degradation of hydrocarbons in crude oil by the ascomycete *Pseudallescheria boydii* (Microascaceae). *Canadian Journal of Microbiology* **44**: 270–278.

Arnér ES, Holmgren A, 2000. Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. *European journal of biochemistry / FEBS* **267**: 6102–6109.

Asano Y, Hagiwara D, Yamashino T, Mizuno T, 2007. Characterization of the bZip-type transcription factor NapA with reference to oxidative stress response in *Aspergillus nidulans*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **71**: 1800–1803.

Asif AR, Oellerich M, Amstrong VW, Gross U, Reichard U, 2010. Analysis of the cellular *Aspergillus fumigatus* proteome that reacts with sera from rabbits developing an acquired immunity after experimental aspergillosis. *Electrophoresis* **31** (12): 1947-1958

Assis DN, Freedman SD, 2016. Gastrointestinal disorders in Cystic Fibrosis. *Clinics in Chest Medicine* **37**: 109–118.

Azad GK, Balkrishna SJ, Sathish N, Kumar S, Tomar RS, 2012. Multifunctional ebselen drug functions through the activation of DNA damage response and alterations in nuclear proteins. *Biochemical Pharmacology* **83**: 296–303.

Babič MN, Zupančič J, Gunde-Cimerman N, de Hoog S, Zalar P, 2017. Ecology of the human opportunistic black yeast *Exophiala dermatitidis* indicates preference for human-made habitats. *Mycopathologia*.

Babior BM, 1984. The respiratory burst of phagocytes. *The Journal of Clinical Investigation* **73**: 599–601.

Bakare N, Rickerts V, Bargon J, Just-Nübling G, 2003. Prevalence of *Aspergillus fumigatus* and other fungal species in the sputum of adult patients with cystic fibrosis. *Mycoses* **46**: 19–23.

Bakerspigel A, Schaus D, 1984. Petriellidosis (pseudallescheriasis) in southwestern Ontario, Canada. *Sabouraudia* **22**: 247–249.

Balandin B, Aguilar M, Sánchez I, Monzón A, Rivera I, Salas C, Valdivia M, Alcántara S, Pérez A, Ussetti P, 2016. *Scedosporium apiospermum* and *S. prolificans* mixed disseminated infection in a lung transplant recipient: An unusual case of long-term survival with combined systemic and local antifungal therapy in intensive care unit. *Medical Mycology Case Reports* **11**: 53–56.

Barondeau DP, Kassmann CJ, Bruns CK, Tainer JA, Getzoff ED, 2004. Nickel superoxide dismutase structure and mechanism. *Biochemistry* **43**: 8038–8047.

Barton RC, Borman AM, Johnson EM, Houbraken J, Hobson RP, Denton M, Conway SP, Brownlee KG, Peckham D, Lee TWR, 2010. Isolation of the fungus *Geosmithia argillacea* in sputum of people with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 2615–2617.

Baxter CG, Dunn G, Jones AM, Webb K, Gore R, Richardson MD, Denning DW, 2013. Novel immunologic classification of aspergillosis in adult cystic fibrosis. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology* **132**: 560–566.e10.

Bell RG, 1976. The development in beef cattle manure of *Petriedllidium boydii* (Shear) Malloch, a potential pathogen for man and cattle. *Canadian Journal of Microbiology* **22**: 552–556.

Bellis G, Dehillotte C, Lemonnier L, 2016. Registre français de la mucoviscidose- Bilan des données 2015.

Bellis G, Fuhrman C, Le Roux E, Rault G, Ravilly S, 2007. Registre Français de la Mucoviscidose-Bilan des données 2005 de l'Observatoire National de la Mucoviscidose.

Belmondo S, Marschall R, Tudzynski P, Ráez JAL, Artuso E, Prandi C, Lanfranco L, 2017. Identification of genes involved in fungal responses to strigolactones using mutants from fungal pathogens. *Current Genetics* **63**: 201–213.

Belozerskaya TA, Gessler NN, 2007. Reactive oxygen species and the strategy of antioxidant defense in fungi: A review. *Applied Biochemistry and Microbiology* **43**: 506–515.

Berenguer J, Rodríguez-Tudela JL, Richard C, Alvarez M, Sanz MA, Gaztelurrutia L, Ayats J, Martinez-Suarez JV, 1997. Deep infections caused by *Scedosporium prolificans*. A report on 16 cases in Spain and a review of the literature. *Scedosporium Prolificans* Spanish Study Group. *Medicine* **76**: 256–265.

Berthon J-Y, Grizard D, 2004. Inoculum fongique, procédés de préparation dudit inoculum et procédés de mise en oeuvre dans le traitement d'effuents riches en matière organique. EP 1352953 A2

Bertrand S, Bouchara J-P, Venier M-C, Richomme P, Duval O, Larcher G, 2010. Nα-methyl coprogen B, a potential marker of the airway colonization by *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Medical Mycology* **48**: S98–S107.

Bertrand S, Larcher G, Landreau A, Richomme P, Duval O, Bouchara J-P, 2009. Hydroxamate siderophores of *Scedosporium apiospermum*. *Biometals: An International Journal on the Role of Metal Ions in Biology, Biochemistry, and Medicine* **22**: 1019–1029.

Berzina I, Trumble NS, Novicki T, Sharkey LC, 2011. Subconjunctival mycetoma caused by *Scedosporium apiospermum* infection in a horse. *Veterinary Clinical Pathology* **40**: 84–88.

Bi C-L, Wang H, Wang Y-J, Sun J, Dong J-S, Meng X, Li J-J, 2016. Selenium inhibits Staphylococcus aureus-induced inflammation by suppressing the activation of the NF-κB and MAPK signalling pathways in RAW264.7 macrophages. *European Journal of Pharmacology* **780**: 159–165.

Billack B, Pietka-Ottlik M, Santoro M, Nicholson S, Młochowski J, Lau-Cam C, 2010. Evaluation of the antifungal and plasma membrane H+-ATPase inhibitory action of ebselen and two ebselen analogs in *S. cerevisiae* cultures. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* **25**: 312–317.

Billack B, Santoro M, Lau-Cam C, 2009. Growth inhibitory action of ebselen on fluconazole-resistant *Candida albicans*: role of the plasma membrane H+-ATPase. *Microbial Drug Resistance* **15**: 77–83.

Billard P, Dumond H, Bolotin-Fukuhara M, 1997. Characterization of an AP-1-like transcription factor that mediates an oxidative stress response in *Kluyveromyces lactis*. *Molecular and General Genetics* **257**: 62–70.

Bink A, Vandenbosch D, Coenye T, Nelis H, Cammue BPA, Thevissen K, 2011. Superoxide dismutases are involved in *Candida albicans* biofilm persistence against miconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**: 4033–4037.

Biswas C, Sorrell TC, Djordjevic JT, Zuo X, Jolliffe KA, Chen SC-A, 2013. In vitro activity of miltefosine as a single agent and in combination with voriconazole or posaconazole against uncommon filamentous fungal pathogens. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **68**: 2842–2846.

Bittencourt VCB, Figueiredo RT, Da Silva RB, Mourão-Sá DS, Fernandez PL, Sassaki GL, Mulloy B, Bozza MT, Barreto-Bergter E, 2006. An α-glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and toll-like receptor activation. *Journal of Biological Chemistry* **281**: 22614–22623.

Blatzer M, Jukic E, Posch W, Schöpf B, Binder U, Steger M, Blum G, Hackl H, Gnaiger E, Lass-Flörl C, Wilflingseder D, 2015. Amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus* is overpowered by coapplication of pro-oxidants. *Antioxidants and Redox Signaling* **23**: 1424–1438.

Blum G, Hörtnagl C, Jukic E, Erbeznik T, Pümpel T, Dietrich H, Nagl M, Speth C, Rambach G, Lass-Flörl C, 2013. New insight into amphotericin B resistance in *Aspergillus terreus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**: 1583–1588.

Blyth CC, Harun A, Middleton PG, Sleiman S, Lee O, Sorrell TC, Meyer W, Chen SCA, 2010a. Detection of occult *Scedosporium* species in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis by use of selective media. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 314–316.

Blyth C, Middleton P, Harun A, Sorrell T, Meyer W, Chen S, 2010b. Clinical associations and prevalence of *Scedosporium spp.* in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Medical Mycology* **48 Suppl 1**: S37-44.

Bonamore A, Boffi A, 2008. Flavohemoglobin: structure and reactivity. *IUBMB life* **60**: 19–28.

Bonifaz A, Tirado-Sánchez A, Calderón L, Saúl A, Araiza J, Hernández M, González GM, Ponce RM, 2014. Mycetoma: experience of 482 cases in a single center in Mexico. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **8**: e3102.

Boom A, Lybaert P, Pollet J-F, Jacobs P, Jijakli H, Golstein PE, Sener A, Malaisse WJ, Beauwens R, 2007. Expression and localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in the rat endocrine pancreas. *Endocrine* **32**: 197–205.

Borghi E, Iatta R, Manca A, Montagna MT, Morace G, 2010. Chronic airway colonization by *Scedosporium apiospermum* with a fatal outcome in a patient with cystic fibrosis. *Medical Mycology* **48 Suppl 1**: S108-113.

Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, Carrère J, Favennec L, Ranque S, Gangneux J-P, Horré R, Bouchara JP, 2010. Lack of standardization in the procedures for mycological examination of sputum samples from CF patients: a possible cause for variations in the prevalence of filamentous fungi. *Medical Mycology* **48 Suppl 1**: S88-97.

Bouchara JP, Hsieh HY, Croquefer S, Barton R, Marchais V, Pihet M, Chang TC, 2009. Development of an oligonucleotide array for direct detection of fungi in sputum samples from patients with Cystic Fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **47**: 142–152.

Boucher RC, Stutts MJ, Knowles MR, Cantley L, Gatzy JT, 1986. Na+ transport in cystic fibrosis respiratory epithelia. Abnormal basal rate and response to adenylate cyclase activation. *The Journal of Clinical Investigation* **78**: 1245–1252.

Boyle MP, De Boeck K, 2013. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. *The Lancet. Respiratory Medicine* **1**: 158–163.

Brandsberg JW, Weeks RJ, Hill WB, Piggott WR, 1969. A study of fungi found in association with *Histoplasma capsulatum*: three bird roosts in S. E. Missouri, U.S.A. *Mycopathologia et Mycologia Applicata* **38**: 71–81.

Brennan S, 2008. Innate immune activation and cystic fibrosis. *Paediatric Respiratory Reviews* **9**: 271-279; quiz 279-280.

Brizuela M, Huang HM, Smith C, Burgio G, Foote SJ, McMorran BJ, 2014. Treatment of erythrocytes with the 2-cys peroxiredoxin inhibitor, Conoidin A, prevents the growth of *Plasmodium falciparum* and enhances parasite sensitivity to chloroquine. *PloS One* **9**: e92411.

Brown RK, Wyatt H, Price JF, Kelly FJ, 1996. Pulmonary dysfunction in cystic fibrosis is associated with oxidative stress. *The European Respiratory Journal* **9**: 334–339.

Bruscia EM, Bonfield TL, 2016. Cystic Fibrosis lung immunity: The role of the macrophage. *Journal of Innate Immunity* **8**: 550–563.

Bueid A, Howard SJ, Moore CB, Richardson MD, Harrison E, Bowyer P, Denning DW, 2010. Azole antifungal resistance in *Aspergillus fumigatus*: 2008 and 2009. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **65**: 2116–2118.

Bui S, Boisserie-Lacroix V, Ceccato F, Clouzeau H, Debeleix S, Fayon M, 2012. Pulmonary inflammation in cystic fibrosis. *Archives de Pédiatrie* **19 Suppl 1**: S8-12.

Buisson N, Labbe-Bois R, 1998. Flavohemoglobin expression and function in *Saccharomyces cerevisiae*. No relationship with respiration and complex response to oxidative stress. *The Journal of Biological Chemistry* **273**: 9527–9533.

Bulman CA, Bidlow CM, Lustigman S, Cho-Ngwa F, Williams D, Rascón AA, Tricoche N, Samje M, Bell A, Suzuki B, Lim KC, Supakorndej N, Supakorndej P, Wolfe AR, Knudsen GM, Chen S, Wilson C, Ang K-H, Arkin M, Gut J, Franklin C, Marcellino C, McKerrow JH, Debnath A, Sakanari JA, 2015. Repurposing auranofin as a lead candidate for treatment of lymphatic filariasis and onchocerciasis. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **9**: e0003534.

Burgel P-R, 2016. Évolutions épidémiologiques de la mucoviscidose en France: perspectives à 10 ans. *Archives de Pédiatrie* **23**: 12S4-12S8.

Burgel P-R, Baixench M-T, Amsellem M, Audureau E, Chapron J, Kanaan R, Honoré I, Dupouy-Camet J, Dusser D, Klaassen CH, Meis JF, Hubert D, Paugam A, 2012. High prevalence of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in adults with cystic fibrosis exposed to itraconazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**: 869–874.

Burgel P-R, Bellis G, Olesen HV, Viviani L, Zolin A, Blasi F, Elborn JS, ERS/ECFS Task Force on Provision of Care for Adults with Cystic Fibrosis in Europe, 2015. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. *The European Respiratory Journal* **46**: 133–141.

Burgel P-R, Paugam A, Hubert D, Martin C, 2016. *Aspergillus fumigatus* in the cystic fibrosis lung: pros and cons of azole therapy. *Infection and Drug Resistance* **9**: 229–238.

Buvelot H, Posfay-Barbe KM, Linder P, Schrenzel J, Krause KH, 2017. *Staphylococcus aureus*, phagocyte NADPH oxidase and chronic granulomatous disease. *FEMS Microbiology Review* **41**: 139-157

Bush A, 2006. *Cystic Fibrosis in the 21st Century*. Karger Medical and Scientific Publishers.

Buzina W, Feierl G, Haas D, Reinthaler FF, Holl A, Kleinert R, Reichenpfader B, Roll P, Marth E, 2006. Lethal brain abscess due to the fungus *Scedosporium apiospermum* (teleomorph *Pseudallescheria boydii*) after a near-drowning incident: case report and review of the literature. *Medical Mycology* **44**: 473–477.

Cabañes FJ, Roura X, García F, Domingo M, Abarca ML, Pastor J, 1998. Nasal granuloma caused by *Scedosporium apiospermum* in a dog. *Journal of Clinical Microbiology* **36**: 2755–2758.

Calderón EJ, Friaza V, Dapena FJ, de La Horra C, 2010. *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis. *Medical Mycology* **48 Suppl 1**: S17-21.

Calera JA, Paris S, Monod M, Hamilton AJ, Debeaupuis JP, Diaquin M, López-Medrano R, Leal F, Latgé JP, 1997. Cloning and disruption of the antigenic catalase gene of *Aspergillus fumigatus*. *Infection and Immunity* **65:** 4718-4724

Calixto ROR, Rollin-Pinheiro R, da Silva MID, Liporagi-Lopes LC, Vieira JM, Sassaki GL, Barreto-Bergter E, 2016. Structural analysis of glucosylceramides (GlcCer) from species of the *Pseudallescheria/Scedosporium* complex. *Fungal Biology* **120**: 166–172.

Campa-Thompson MM, West JA, Guileyardo JM, Spak CW, Sloan LM, Beal SG, 2014. Clinical and morphologic findings in disseminated *Scedosporium apiospermum* infections in immunocompromised patients. *Proceedings* **27**: 253–256.

Campbell EL, Colgan SP, 2015. Neutrophils and inflammatory metabolism in antimicrobial functions of the mucosa. *Journal of Leukocyte Biology* **98**: 517–522.

Campbell WH, Kinghorn KR, 1990. Functional domains of assimilatory nitrate reductases and nitrite reductases. *Trends in Biochemical Sciences* **15**: 315–319.

Cannon RD, Lamping E, Holmes AR, Niimi K, Tanabe K, Niimi M, Monk BC, 2007. *Candida albicans* drug resistance another way to cope with stress. *Microbiology* **153**: 3211–3217.

Cantin AM, Hartl D, Konstan MW, Chmiel JF, 2015. Inflammation in cystic fibrosis lung disease: Pathogenesis and therapy. *Journal of Cystic Fibrosis* **14**: 419–430.

Capilla J, Guarro J, 2004. Correlation between *in vitro* susceptibility of *Scedosporium apiospermum* to voriconazole and *in vivo* outcome of scedosporiosis in guinea pigs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **48**: 4009–4011.

Caroli A, Simeoni S, Lepore R, Tramontano A, Via A, 2012. Investigation of a potential mechanism for the inhibition of *Sm*TGR by Auranofin and its implications for *Plasmodium falciparum* inhibition. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **417**: 576–581.

Caro-Vadillo A, García-Real I, Payá-Vicens MJ, Sainz-Rodríguez A, Rodríguez-Franco F, Rodríguez-Bertos A, 2005. Fungal rhinitis caused by *Scedosporium apiospermum* in a labrador retriever. *The Veterinary Record* **157**: 175–177.

Cartwright GM, Scott B, 2013. Redox Regulation of an AP-1-Like Transcription factor, YapA, in the fungal symbiont *Epichloë festucae*. *Eukaryotic Cell* **12**: 1335–1348.

Cassetta MI, Marzo T, Fallani S, Novelli A, Messori L, 2014. Drug repositioning: auranofin as a prospective antimicrobial agent for the treatment of severe staphylococcal infections. *Biometals* **27**: 787–791.

Castelli MV, Buitrago MJ, Bernal-Martinez L, Gomez-Lopez A, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, 2008. Development and validation of a quantitative PCR assay for diagnosis of scedosporiosis. *Journal of Clinical Microbiology* **46**: 3412–3416.

Chabasse D, Bouchara J, Chazalette J, Carrère J, Giniès J, de Gentile L, Cimon B, 1991. Mucoviscidose et colonisation fongique à *Scedosporium apiospermum*. A propos de trois observations. *Journal de Mycologie Médicale* **1**: 152–55.

Chagas-Neto TC, Chaves GM, Colombo AL, 2008. Update on the genus *Trichosporon*. *Mycopathologia* **166**: 121–132.

Chagas-Neto TC, Chaves GM, Melo ASA, Colombo AL, 2009. Bloodstream infections due to *Trichosporon spp.*: species distribution, *Trichosporon asahii* genotypes determined on the basis of ribosomal DNA intergenic spacer 1 sequencing, and antifungal susceptibility testing. *Journal of Clinical Microbiology* **47**: 1074–1081.

Chan G, Hardej D, Santoro M, Lau-Cam C, Billack B, 2007. Evaluation of the antimicrobial activity of ebselen: role of the yeast plasma membrane H^+-ATPase. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **21**: 252–264.

Charles I, Alber D, 2016. Methods for the inhibition and dispersal of biofilms using auranofin. WO 2016124935A1

Chassot F, Pozzebon Venturini T, Baldissera Piasentin F, Morais Santurio J, Estivalet Svidzinski TI, Hartz Alves S, 2016. Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen against echinocandin-susceptible and -resistant strains of *Candida parapsilosis*. *The New Microbiologica* **39**: 301–303.

Chaves GM, Bates S, Maccallum DM, Odds FC, 2007. *Candida albicans* GRX2, encoding a putative glutaredoxin, is required for virulence in a murine model. *Genetics and molecular research* **6**: 1051–1063.

Chaves GM, Silva WP da, 2012. Superoxide dismutases and glutaredoxins have a distinct role in the response of *Candida albicans* to oxidative stress generated by the chemical compounds menadione and diamide. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **107**: 998–1005.

Chelikani P, Fita I, Loewen PC, 2004. Diversity of structures and properties among catalases. *Cellular and molecular life sciences* **61**: 192–208.

Chen S, Aronow ME, Wang C, Shen D, Chan C-C, 2014. Classical pathology of sympathetic ophthalmia presented in a unique case. *The Open Ophthalmology Journal* **8**: 32–38.

Chen T-C, Ho M-W, Chien W-C, Lin H-H, 2016. Disseminated *Scedosporium apiospermum* infection in a near-drowning patient. *Journal of the Formosan Medical Association* **115**: 213–214.

Cheng Z, Lou L, Liu D, Li X, Proksch P, Yin S, Lin W, 2016. Versiquinazolines A-K, fumiquinazoline-type alkaloids from the gorgonian-derived fungus *Aspergillus versicolor* LZD-14-1. *Journal of Natural Products* **79**: 2941–2952.

Chen L-H, Tsai H-C, Yu P-L, Chung K-R, 2017. A major facilitator superfamily transporter-mediated resistance to oxidative stress and fungicides requires Yap1, Skn7, and MAP kinases in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *PloS One* **12**: e0169103.

Chung K-R, 2012. Stress response and pathogenicity of the necrotrophic fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Scientifica* **2012**: 635431.

Cimon B, Carrère J, Chazalette JP, Ginies JL, Chabasse D, Bouchara JP, 2000a. Bronchopulmonary mycoses in cystic fibrosis: results of a five-year longitudinal study. *Journal de Mycologie Médicale* **10**: 128–135.

Cimon B, Carrère J, Chazalette J, Giniès J, Six P, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP, 1995. Fungal colonization and immune response to fungi in cystic fibrosis. *Journal de Mycologie Médicale* **5**: 211–216.

Cimon B, Carrere J, Chazalette JP, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP, 1999. Chronic airway colonization by *Penicillium emersonii* in a patient with cystic fibrosis. *Medical Mycology* **37**: 291–293.

Cimon B, Carrère J, Vinatier JF, Chazalette JP, Chabasse D, Bouchara JP, 2000b. Clinical significance of *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **19**: 53–56.

Cimon B, Challier S, Béguin H, Carrère J, Chabasse D, Bouchara JP, 2005. Airway colonization by *Acrophialophora fusispora*cimon in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 1484–1487.

Cimon B, Symoens F, Zouhair R, Chabasse D, Nolard N, Defontaine A, Bouchara JP, 2001. Molecular epidemiology of airway colonisation by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. *Journal of Medical Microbiology* **50**: 367–374.

Claussen M, Schmidt S, 1998. Biodegradation of phenol and p-cresol by the hyphomycete *Scedosporium apiospermum*. *Research in Microbiology* **149**: 399–406.

Claussen M, Schmidt S, 1999. Biodegradation of phenylbenzoate and some of its derivatives by *Scedosporium apiospermum*. *Research in Microbiology* **150**: 413–420.

Coleman MG, Robson MC, 2005. Nasal infection with *Scedosporium apiospermum* in a dog. *New Zealand Veterinary Journal* **53**: 81–83.

Compain F, Botterel F, Sitterlé E, Paugam A, Bougnoux M-E, Dannaoui E, 2015. In vitro activity of miltefosine in combination with voriconazole or amphotericin B against clinical isolates of *Scedosporium spp*. *Journal of Medical Microbiology* **64**: 309–311.

Conrad M, Schneider M, Seiler A, Bornkamm GW, 2007. Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals. *Biological Chemistry* **388**: 1019–25.

Cooley L, Spelman D, Thursky K, Slavin M, 2007. Infection with *Scedosporium apiospermum* and *S. prolificans*, Australia. *Emerging Infectious Diseases* **13**: 1170–1177.

Coombs GH, Westrop GD, Suchan P, Puzova G, Hirt RP, Embley TM, Mottram JC, Müller S, 2004. The amitochondriate eukaryote *Trichomonas vaginalis* contains a divergent thioredoxin-linked peroxiredoxin antioxidant system. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 5249–5256.

Coron N, Pihet M, Fréalle E, Lemeille Y, Pinel C, Pelloux H, Gargala G, Favennec L, Accoceberry I, Durand-Joly I, Dalle F, Huet F, Fanton A, Boldron A, Loeuille GA, Domblides P, Coltey B, Pin I, Llerena C, Troussier F, Person C, Marguet C, Wizla N, Thumerelle C, Turck D, Bui S, Fayon M, Duhamel A, Wallaert B, Leroy S, Bouchara JP, Delhaes L, 2017. Towards the standardization of mycological examination of sputum samples in cystic fibrosis – results from a French multicenter prospective study. *Mycopathologia*

Cortez KJ, Roilides E, Quiroz-Telles F, Meletiadis J, Antachopoulos C, Knudsen T, Buchanan W, Milanovich J, Sutton DA, Fothergill A, Rinaldi MG, Shea YR, Zaoutis T, Kottilil S, Walsh TJ, 2008. Infections caused by *Scedosporium spp*. *Clinical Microbiology Reviews* **21**: 157–197.

Crameri R, Faith A, Hemmann S, Jaussi R, Ismail C, Menz G, Blaser K, 1996. Humoral and cell-mediated autoimmunity in allergy to *Aspergillus fumigatus*. *The Journal of Experimental Medicine* **184**: 265–270.

Crawford DR, Davies KJ, 1994. Adaptive response and oxidative stress. *Environmental Health Perspectives* **102 Suppl 10**: 25–28.

Crous PW, Wingfield MJ, Burgess TI, Hardy GESJ, Crane C, Barrett S, Cano-Lira JF, Le Roux JJ, Thangavel R, Guarro J, Stchigel AM, Martín MP, Alfredo DS, Barber PA, Barreto RW, Baseia IG, Cano-Canals J, Cheewangkoon R, Ferreira RJ, Gené J, Lechat C, Moreno G, Roets F, Shivas RG, Sousa JO, Tan YP, Wiederhold NP, Abell SE, Accioly T, Albizu JL, Alves JL, Antoniolli ZI, Aplin N, Araújo J, Arzanlou M, Bezerra JDP, Bouchara JP, Carlavilla JR, Castillo A, Castroagudín VL, Ceresini PC, *et al*, 2016. Fungal Planet description sheets: 469-557. *Persoonia* **37**: 218–403.

Cruz R, Barros M, Reyes M, 2015. Pulmonary non invasive infection by *Scedosporium apiospermum*. *Revista Chilena De Infectologia* **32**: 472–475.

Cutting GR, 2015. Cystic fibrosis genetics: from molecular understanding to clinical application. *Nature Reviews. Genetics* **16**: 45–56.

Dai B-D, Wang Y, Zhao L-X, Li D-D, Li M-B, Cao Y-B, Jiang Y-Y, 2013. Cap1p attenuates the apoptosis of *Candida albicans*. *The FEBS journal* **280**: 2633–2643.

Dankai W, Pongpom M, Youngchim S, Cooper CR, Vanittanakom N, 2016. The yapA encodes b*ZIP* transcription factor involved in stress tolerance in pathogenic fungus *Talaromyces marneffei*. *PloS One* **11**: e0163778.

Dantas AS, Andrade RV, de Carvalho MJ, Felipe MSS, Campos EG, 2008. Oxidative stress response in *Paracoccidioides brasiliensis*: assessing catalase and cytochrome c peroxidase. *Mycological Research* **112**: 747–756.

Dantas A da S, Day A, Ikeh M, Kos I, Achan B, Quinn J, 2015. Oxidative stress responses in the human fungal pathogen, *Candida albicans*. *Biomolecules* **5**: 142–165.

De Boeck K, Amaral MD, 2016. Progress in therapies for cystic fibrosis. *The Lancet Respiratory Medicine* **4**: 662–674.

De Brucker K, Bink A, Meert E, Cammue BPA, Thevissen K, 2013. Potentiation of antibiofilm activity of amphotericin B by superoxide dismutase inhibition. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2013**: 704654.

De Cremer K, De Brucker K, Staes I, Peeters A, Van den Driessche F, Coenye T, Cammue BPA, Thevissen K, 2016. Stimulation of superoxide production increases fungicidal action of miconazole against *Candida albicans* biofilms. *Scientific Reports* **6** :27463.

De Hoog GS, Marvin-Sikkema FD, Lahpoor GA, Gottschall JC, Prins RA, Guého E, 1994. Ecology and physiology of the emerging opportunistic fungi *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium prolificans*. *Mycoses* **37**: 71–78.

De Ravin SS, Challipalli M, Anderson V, Shea YR, Marciano B, Hilligoss D, Marquesen M, Decastro R, Liu Y-C, Sutton DA, Wickes BL, Kammeyer PL, Sigler L, Sullivan K, Kang EM, Malech HL, Holland SM, Zelazny AM, 2011. *Geosmithia argillacea* : an emerging cause of invasive mycosis in human chronic granulomatous disease. *Clinical Infectious Diseases* **52**: e136-143.

Debnath A, Ndao M, Reed SL, 2013. Reprofiled drug targets ancient protozoans: drug discovery for parasitic diarrheal diseases. *Gut Microbes* **4**: 66–71.

Debnath A, Parsonage D, Andrade RM, He C, Cobo ER, Hirata K, Chen S, García-Rivera G, Orozco E, Martínez MB, Gunatilleke SS, Barrios AM, Arkin MR, Poole LB, McKerrow JH, Reed SL, 2012. A high-throughput drug screen for *Entamoeba histolytica* identifies a new lead and target. *Nature Medicine* **18**: 956–960.

Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, Carrère J, Bailly E, Symoens F, Diouri M, Hallet J-N, Bouchara JP, 2002. Genotyping study of *Scedosporium apiospermum* isolates from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **40**: 2108–2114.

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

Delhaes L, Monchy S, Fréalle E, Hubans C, Salleron J, Leroy S, Prevotat A, Wallet F, Wallaert B, Dei-Cas E, Sime-Ngando T, Chabé M, Viscogliosi E, 2012. The airway microbiota in cystic fibrosis: a complex fungal and bacterial community--implications for therapeutic management. *PloS One* **7**: e36313.

Denton EJ, Smibert O, Gooi J, Morrissey CO, Snell G, McGiffin D, Paraskeva M, 2016. Invasive *Scedosporium* sternal osteomyelitis following lung transplant: Cured. *Medical Mycology Case Reports* **12**: 14–16.

Desai G, Nassar F, Brummer E, Stevens DA, 1995. Killing of *Histoplasma capsulatum* by macrophage colony stimulating factor-treated human monocyte-derived macrophages: role for reactive oxygen intermediates. *Journal of Medical Microbiology* **43**: 224–229.

di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E, 1953. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; its clinical significance and relationship to the disease. *Pediatrics* **12**: 549–563

di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E, 1953. Sweat electrolyte disturbances associated with childhood pancreatic disease. *American Journal of Medecine* **15**: 777-784.

Dickinson DA, Forman HJ, 2002. Glutathione in defense and signaling: lessons from a small thiol. *Annals of the New York Academy of Sciences* **973**: 488–504.

Diemert D, Kunimoto D, Sand C, Rennie R, 2001. Sputum isolation of *Wangiella dermatitidis* in patients with cystic fibrosis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **33**: 777–779.

Díez-Martínez R, García-Fernández E, Manzano M, Martínez Á, Domenech M, Vallet-Regí M, García P, 2016. Auranofin-loaded nanoparticles as a new therapeutic tool to fight streptococcal infections. *Scientific Reports* **6**: 19525.

Ding M, Kwok LY, Schlüter D, Clayton C, Soldati D, 2004. The antioxidant systems in *Toxoplasma gondii* and the role of cytosolic catalase in defence against oxidative injury. *Molecular Microbiology* **51**: 47–61.

Doern GV, Brogden-Torres B, 1992. Optimum use of selective plated media in primary processing of respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **30**: 2740–2742.

Domínguez C, Gartner S, Liñán S, Cobos N, Moreno A, 1998. Enhanced oxidative damage in cystic fibrosis patients. *BioFactors* **8**: 149–153.

Dumond H, Danielou N, Pinto M, Bolotin-Fukuhara M, 2000. A large-scale *Stu*dy of Yap1p-dependent genes in normal aerobic and H_2O_2-stress conditions: the role of Yap1p in cell proliferation control in yeast. *Molecular Microbiology* **36**: 830–845.

Durupt S, Mazur S, Reix P, 2016. Therapeutic advances in cystic fibrosis in 2014. *Revue De Pneumologie Clinique* **72**: 77–86.

Duvaux L, Shiller J, Vandeputte P, Dugé de Bernonville T, Thornton C, Papon N, Le Cam B, Bouchara JP, Gastebois A, 2017. Draft genome sequence of the human pathogen fungus *Scedosporium boydii*. *Genome Announcements* **5:** e00871-17.

Elad D, 2011. Infections caused by fungi of the *Scedosporium/Pseudallescheria* complex in veterinary species. *Veterinary Journal* **187**: 33–41.

Elad D, Perl S, Yamin G, Blum S, David D, 2010. Disseminated pseudallescheriosis in a dog. *Medical Mycology* **48**: 635–638.

Elborn JS, 2016. Cystic fibrosis. *Lancet* **388**: 2519–2531.

Erman JE, Vitello LB, 2002. Yeast cytochrome c peroxidase: mechanistic studies via protein engineering. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1597**: 193–220.

Ellis D, 2002. Amphotericin B: spectrum and resistance. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **49 Suppl 1**: 7–10.

Espinel-Ingroff A, Johnson E, Hockey H, Troke P, 2008. Activities of voriconazole, itraconazole and amphotericin B in vitro against 590 moulds from 323 patients in the voriconazole Phase III clinical studies. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **61**: 616–620.

Espinosa-Diez C, Miguel V, Mennerich D, Kietzmann T, Sánchez-Pérez P, Cadenas S, Lamas S, 2015. Antioxidant responses and cellular adjustments to oxidative stress. *Redox Biology* **6**: 183–197.

Esther CR, Plongla R, Kerr A, Lin F-C, Gilligan P, 2016. Clinical outcomes in cystic fibrosis patients with *Trichosporon* respiratory infection. *Journal of Cystic Fibrosis:* **15**: e45-49.

Fadzillah M-T, Ishak S-R, Ibrahim M, 2013. Refractory *Scedosporium apiospermum* keratitis successfully treated with combination of amphotericin B and voriconazole. *Case Reports in Ophthalmological Medicine* **2013**: 413953.

Fang FC, 2004. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: concepts and controversies. *Nature Reviews. Microbiology* **2**: 820–832.

Fernandez-Flores A, Lopez-Medrano R, Fuster-Foz C, 2016. Histopathological clues in the diagnosis of fungal infection by *Scedosporium* in a case of endophthalmitis starting as conjunctivitis. *Journal of Cutaneous Pathology* **43**: 461–467.

Fernandez J, Wilson R, 2014. Characterizing roles for the glutathione reductase, thioredoxin reductase and thioredoxin peroxidase-encoding genes of *Magnaporthe oryzae* during rice blast disease. *PloS One* **9** (1): e87300.

Figueiredo RT, Fernandez PL, Dutra FF, Gonzalez Y, Lopes LC, Bittencourt VCB, Sassaki GL, Barreto-Bergter E, Bozza MT, 2010. TLR4 recognizes *Pseudallescheria boydii* conidia and purified rhamnomannans. *Journal of Biological Chemistry* **285**: 40714–40723.

Fischer J, van Koningsbruggen-Rietschel S, Rietschel E, Vehreschild MJGT, Wisplinghoff H, Krönke M, Hamprecht A, 2014. Prevalence and molecular characterization of azole resistance in *Aspergillus spp.* isolates from German cystic fibrosis patients. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**: 1533–1536.

Fisher JF, Shadomy S, Teabeaut JR, Woodward J, Michaels GE, Newman MA, White E, Cook P, Seagraves A, Yaghmai F, Rissing JP, 1982. Near-drowning complicated by brain abscess due to *Petriellidium boydii*. *Archives of Neurology* **39**: 511–513.

Forrester MT, Eyler CE, Rich JN, 2011. Bacterial flavohemoglobin: a molecular tool to probe mammalian nitric oxide biology. *BioTechniques* **50**: 41–45.

Forrester MT, Foster MW, 2012. Protection from nitrosative stress: a central role for microbial flavohemoglobin. *Free Radical Biology and Medicine* **52**: 1620–1633.

Fradin C, De Groot P, MacCallum D, Schaller M, Klis F, Odds FC, Hube B, 2005. Granulocytes govern the transcriptional response, morphology and proliferation of *Candida albicans* in human blood. *Molecular Microbiology* **56**: 397–415.

Fridovich I, 1989. Superoxide dismutases. An adaptation to a paramagnetic gas. *Journal of Biological Chemistry* **264**: 7761–7764.

Fridovich I, 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. : 97–112.

Fridovich I, 2001. Oxidative Stress. In: *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd,.

Frohner IE, Bourgeois C, Yatsyk K, Majer O, Kuchler K, 2009. *Candida albicans* cell surface superoxide dismutases degrade host-derived reactive oxygen species to escape innate immune surveillance. *Molecular Microbiology* **71**: 240–252.

Fuchs BB, RajaMuthiah R, Souza ACR, Eatemadpour S, Rossoni RD, Santos DA, Junqueira JC, Rice LB, Mylonakis E, 2016. Inhibition of bacterial and fungal pathogens by the orphaned drug auranofin. *Future Medicinal Chemistry* **8**: 117–132.

Gadsby DC, Vergani P, Csanády L, 2006. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. *Nature* **440**: 477–483.

Gamberi T, Fiaschi T, Modesti A, Massai L, Messori L, Balzi M, Magherini F, 2015. Evidence that the antiproliferative effects of auranofin in *Saccharomyces cerevisiae* arise from inhibition of mitochondrial respiration. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **65**: 61–71.

Garczewska B, Jarzynka S, Kuś J, Skorupa W, Augustynowicz-Kopeć E, 2016. Fungal infection of cystic fibrosis patients - single center experience. *Pneumonologia I Alergologia Polska* **84**: 151–159.

Garfoot AL, Rappleye CA, 2016. *Histoplasma capsulatum* surmounts obstacles to intracellular pathogenesis. *The FEBS journal* **283**: 619–633.

Gasch AP, Spellman PT, Kao CM, Carmel-Harel O, Eisen MB, Storz G, Botstein D, Brown PO, 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell* **11**: 4241–4257.

Gessler NN, Aver'yanov AA, Belozerskaya TA, 2007. Reactive oxygen species in regulation of fungal development. *Biochemistry. Biokhimiâ* **72**: 1091–1109.

Ghamrawi S, Gastebois A, Zykwinska A, Vandeputte P, Marot A, Mabilleau G, Cuenot S, Bouchara JP, 2015. A multifaceted study of *Scedosporium boydii* cell wall changes during germination and identification of GPI-anchored proteins. *PLoS One* **10**: e0128680.

Ghamrawi S, Rénier G, Saulnier P, Cuenot S, Zykwinska A, Dutilh BE, Thornton C, Faure S, Bouchara JP, 2014. Cell wall modifications during conidial maturation of the human pathogenic fungus *Pseudallescheria boydii*. *PLoS One* **9**: e100290.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J, 2005. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. *Journal of Clinical Microbiology* **43**: 4930–4942.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J, 2009. Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Medical Mycology* **47**:371–374.

Gilgado F, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J, 2008. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for *Scedosporium apiospermum* and *Pseudallescheria boydii* and the proposed new species *Scedosporium dehoogii*. *Journal of Clinical Microbiology* **46**: 766–771.

Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J, 2006. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **50**: 4211–4213.

Gil-Lamaignere C, Roilides E, Lyman CA, Simitsopoulou M, Stergiopoulou T, Maloukou A, Walsh TJ, 2003. Human phagocytic cell responses to *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*): variable susceptibility to oxidative injury. *Infection and Immunity* **71**: 6472–6478.

Giraud S, Favennec L, Bougnoux M-E, Bouchara JP, 2013. *Rasamsonia argillacea* species complex: taxonomy, pathogenesis and clinical relevance. *Future Microbiology* **8**: 967–978.

Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, Carrère J, Degand N, Mély L, Favennec L, Dannaoui E, Bouchara JP, Calenda A, 2010. *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 2381–2386.

Glaser AG, Menz G, Kirsch Al, Zeller S, Crameri R, Rhyner C, 2008. Auto- and cross-reactivity to thioredoxin allergens in allergic bronchopulmonary aspergillosis. *Allergy* **63:** 1617-1623.

Gleason JE, Galaleldeen A, Peterson RL, Taylor AB, Holloway SP, Waninger-Saroni J, Cormack BP, Cabelli DE, Hart PJ, Culotta VC, 2014. *Candida albicans* SOD5 represents the prototype of an unprecedented class of Cu-only superoxide dismutases required for pathogen defense. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **111**: 5866–5871.

Godoy JSR, Kioshima ÉS, Abadio AKR, Felipe MSS, de Freitas SM, Svidzinski TIE, 2015. Structural and functional characterization of the recombinant thioredoxin reductase from *Candida albicans* as a potential target for vaccine and drug design. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**: 4015–4025.

Goldblatt D 2014. Recent advances in chronic granulomatous disease. Journal of Infection **69 Suppl 1:** 32-35.

Goldberg I, Hochman A, 1989. Three different types of catalases in *Klebsiella pneumoniae*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **268**: 124–128.

Goldenberger D, Hinić V, Prince SS, Tamm M, Balestra A-M, Hohler D, Frei R, 2016. A case report of a cystic fibrosis patient with repeated isolation of *Trichosporon mycotoxinivorans* identified by a novel short-extraction method. *BMC infectious diseases* **16**: 601.

Goldman C, Akiyama MJ, Torres J, Louie E, Meehan SA, 2016. *Scedosporium apiospermum* infections and the role of combination antifungal therapy and GM-CSF: A case report and review of the literature. *Medical Mycology Case Reports* **11**: 40–43.

González-Escalada A, Del Palacio A, Calvo MT, Gené J, Guarro J, 2000. Two cases of scalp wound colonization and respiratory tract by mycelial fungi. *Revista Iberoamericana De Micologia* **17**: 149–151.

Gonzalez-Garcia FJ, Guzman-Puche J, Redel-Montero J, Moreno P, 2017. Fatal bilateral haemopneumothoraces following double-lung transplantation caused by pretransplant colonization by *Scedosporium apiospermum*. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* **51**: 1209.

Gónzalez-Párraga P, Alonso-Monge R, Plá J, Argüelles JC, 2010. Adaptive tolerance to oxidative stress and the induction of antioxidant enzymatic activities in *Candida albicans* are independent of the Hog1 and Cap1-mediated pathways. *FEMS yeast research* **10**: 747–756.

González-Párraga P, Hernández JA, Argüelles JC, 2003. Role of antioxidant enzymatic defences against oxidative stress (H_2O_2) and the acquisition of oxidative tolerance in *Candida albicans*. *Yeast* **20**: 1161–1169.

González-Párraga P, Sánchez-Fresneda R, Zaragoza O, Argüelles J-C, 2011. Amphotericin B induces trehalose synthesis and simultaneously activates an antioxidant enzymatic response in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1810**: 777–783.

Gopal R, Kim YG, Lee JH, Lee SK, Chae JD, Son BK, Seo CH, Park Y, 2014. Synergistic effects and antibiofilm properties of chimeric peptides against multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**: 1622–1629.

Gopinath M, Cherian A, Baheti NN, Das A, Antony M, Sarada C, 2010. An elusive diagnosis: *Scedosporium apiospermum* infection after near-drowning. *Annals of Indian Academy of Neurology* **13**: 213–215.

Gordhan HM, Patrick SL, Swasy MI, Hackler AL, Anayee M, Golden JE, Morris JC, Whitehead DC, 2017. Evaluation of substituted ebselen derivatives as potential trypanocidal agents. *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters* **27**: 537–541.

Gottesman-Yekutieli T, Shwartz O, Edelman A, Hendel D, Dan M, 2011. *Pseudallescheria boydii* infection of a prosthetic hip joint--an uncommon infection in a rare location. *The American Journal of the Medical Sciences* **342**: 250–253.

Grant CM, 2001. Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology* **39**: 533–541.

Grant CM, Maciver FH, Dawes IW, 1996. Stationary-phase induction of GLR1 expression is mediated by the yAP-1 transcriptional regulatory protein in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **22**: 739–746.

Green HD, Bright-Thomas RJ, Mutton KJ, Guiver M, Jones AM, 2016. Increased prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonisation in acute pulmonary exacerbations of cystic fibrosis. *The Journal of Infection* **73**: 1–7.

Griffard EA, Guajardo JR, Cooperstock MS, Scoville CL, 2010. Isolation of *Exophiala dermatitidis* from pigmented sputum in a cystic fibrosis patient. *Pediatric Pulmonology* **45**: 508–510.

Guarro J, Kantarcioglu AS, Horré R, Rodriguez-Tudela JL, Cuenca Estrella M, Berenguer J, de Hoog GS, 2006. *Scedosporium apiospermum*: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. *Medical Mycology* **44**: 295–327.

Guevara-Flores A, Del Arenal IP, Mendoza-Hernández G, Pardo JP, Flores-Herrera O, Rendón JL, 2010. Mitochondrial thioredoxin-glutathione reductase from larval *Taenia crassiceps* (Cysticerci). *Journal of Parasitology Research* **2010**. pii: 719856.

Gugnani HC, 1972. Fungi isolated from lungs of small wild animals in India. *Mykosen* **15**: 479–482.

Guinea J, Peláez T, Recio S, Torres-Narbona M, Bouza E, 2008. *In vitro* antifungal activities of isavuconazole (BAL4815), voriconazole, and fluconazole against 1,007 isolates of zygomycete, *Candida*, *Aspergillus*, *Fusarium*, and *Scedosporium* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 1396–1400.

Guirao-Abad JP, Sánchez-Fresneda R, Alburquerque B, Hernández JA, Argüelles J-C, 2017. ROS formation is a differential contributory factor to the fungicidal action of Amphotericin B and Micafungin in *Candida albicans*. *International Journal of Medical Microbiology* **307**: 241–248.

Guo M, Chen Y, Du Y, Dong Y, Guo W, Zhai S, Zhang H, Dong S, Zhang Z, Wang Y, Wang P, Zheng X, 2011. The b*ZIP* transcription factor MoAP1 mediates the oxidative stress response and is critical for pathogenicity of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *PLoS pathogens* **7**: e1001302.

Guo JJ, Stoltz DA, Zhu V, Volk KA, Segar JL, McCray PB, Roghair RD, 2014. Genotype-specific alterations in vascular smooth muscle cell function in cystic fibrosis piglets. *Journal of Cystic Fibrosis* **13**: 251–259.

Gupta MK, Banerjee T, Kumar D, Rastogi A, Tilak R, 2013. White grain mycetoma caused by *Scedosporium apiospermum* in North India: a case report. *The International Journal of Lower Extremity Wounds* **12**: 286–288.

Gustafsson TN, Osman H, Werngren J, Hoffner S, Engman L, Holmgren A, 2016. Ebselen and analogs as inhibitors of *Bacillus anthracis* thioredoxin reductase and bactericidal antibacterials targeting *Bacillus* species, *Staphylococcus aureus* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1860**: 1265–1271.

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

Haase G, Skopnik H, Kusenbach G, 1990. *Exophiala dermatitidis* infection in cystic fibrosis. *Lancet* **336**: 188–189.

Hall A, Nelson K, Poole LB, Karplus PA, 2011. Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins. *Antioxidants and Redox Signaling* **15**: 795–815.

Hall N, Tomsett AB, 2000. Structure-function analysis of NADPH:nitrate reductase from *Aspergillus nidulans*: analysis of altered pyridine nucleotide specificity in vivo. *Microbiology* **146**: 1399–1406.

Halliday CL, Chen SC-A, Kidd SE, van Hal S, Chapman B, Heath CH, Lee A, Kennedy KJ, Daveson K, Sorrell TC, Morrissey CO, Marriott DJ, Slavin MA, 2016. Antifungal susceptibilities of non-Aspergillus filamentous fungi causing invasive infection in Australia: support for current antifungal guideline recommendations. *International Journal of Antimicrobial Agents* **48**: 453–458.

Hamilton AJ, Holdom MD, Hay RJ, 1995. Specific recognition of purified Cu,Zn superoxide dismutase from *Aspergillus fumigatus* by immune human sera. *Journal of Clinical Microbiology* **33**: 495–496.

Hamilton AJ, Holdom MD, Jeavons L, 1996. Expression of the Cu,Zn superoxide dismutase of *Aspergillus fumigatus* as determined by immunochemistry and immunoelectron microscopy. *FEMS immunology and medical microbiology* **14**: 95–102.

Hamprecht A, Morio F, Bader O, Le Pape P, Steinmann J, Dannaoui E, 2017. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis: a matter of concern? *Mycopathologia*.

Han Z, Kautto L, Nevalainen H, 2017. Secretion of proteases by an opportunistic fungal pathogen *Scedosporium aurantiacum*. *PloS One* **12**: e0169403.

Haraldsen JD, Liu G, Botting CH, Walton JGA, Storm J, Phalen TJ, Kwok LY, Soldati-Favre D, Heintz NH, Müller S, Westwood NJ, Ward GE, 2009. Identification of conoidin A as a covalent inhibitor of peroxiredoxin II. *Organic and Biomolecular Chemistry* **7**: 3040–3048.

Harbut MB, Vilchèze C, Luo X, Hensler ME, Guo H, Yang B, Chatterjee AK, Nizet V, Jacobs WR, Schultz PG, Wang F, 2015. Auranofin exerts broad-spectrum bactericidal activities by targeting thiol-redox homeostasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **112**: 4453–4458.

Hardison R, 1998. Hemoglobins from bacteria to man: evolution of different patterns of gene expression. *The Journal of Experimental Biology* **201**: 1099–1117.

Harrison MK, Hiatt KH, Smoller BR, Cheung WL, 2012. A case of cutaneous *Scedosporium* infection in an immunocompromised patient. *Journal of Cutaneous Pathology* **39**: 458–460.

Hartmann C, Müller C, Weißbrodt H, Suerbaum S, Tintelnot K, Stolle S, Hansen G, Sedlacek L, 2013. Successful prevention of scedosporiosis after lung transplantation in a cystic fibrosis patient by combined local and systemic triazole therapy. *Medical Mycology Case Reports* **2**: 116–118.

Harun A, Blyth CC, Gilgado F, Middleton P, Chen SC-A, Meyer W, 2011. Development and validation of a multiplex PCR for detection of *Scedosporium spp.* in respiratory tract specimens from patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 1508–1512.

Harun A, Gilgado F, Chen SC-A, Meyer W, 2010. Abundance of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in the Australian urban environment suggests a possible source for scedosporiosis including the colonization of airways in cystic fibrosis. *Medical Mycology* **48 Suppl 1**: S70-76.

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

Haulena M, Buckles E, Gulland FMD, Lawrence JA, Wong A, Jang S, Christopher MM, Lowenstine LJ, 2002. Systemic mycosis caused by *Scedosporium apiospermum* in a stranded northern elephant seal (Mirounga angustirostris) undergoing rehabilitation. *Journal of Zoo and Wildlife Medicine* **33**: 166–171.

Hays SR, Ferrando RE, Carter R, Wong HH, Woodruff PG, 2005. Structural changes to airway smooth muscle in cystic fibrosis. *Thorax* **60**: 226–228.

Heath C, Slavin M, Sorrell T, Handke R, Harun A, Phillips M, Nguyen Q, Delhaes L, Ellis D, Meyer W, Chen SCA, Australian *Scedosporium* Study Group, 2009. Population-based surveillance for scedosporiosis in Australia: epidemiology, disease manifestations and emergence of *Scedosporium aurantiacum* infection. *Clinical Microbiology and Infection* **15**: 689–693.

Hector A, Griese M, Hartl D, 2014. Oxidative stress in cystic fibrosis lung disease: an early event, but worth targeting? *The European Respiratory Journal* **44**: 17–19.

Hemmann S, Blaser K, Crameri R, 1997. Allergen of *Aspergillus fumigatus* and *Candida boidinii* share IgE-binding epitopes. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medecine* **156:** 1956-1962.

Hemmann S, Menz G, Ismail C, Blaser K, Crameri R 1999. Skin test reactivity to 2 recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens in *A fumigatus*-sensitized asthmatic subjects allows diagnostic separation of allergic bronchopulmonary aspergillosis from fungal sensitization. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **104:** 601-607.

Hemman S, Nikilaisik WH, Schöni MH, Blaser K, Crameri R, 1998. Differential IgE recognition of recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens by cystic fibrosis patients with allergic bronchopulmonary aspergillosis or *Aspergillus* allergy. *European Journal of Immunology* **28:** 1155-60.

Henao-Martínez AF, Castillo-Mancilla JR, Barron MA, Nichol AC, 2013. Combination antifungal therapy in the treatment of *Scedosporium apiospermum* central nervous system infections. *Case Reports in Infectious Diseases* **2013**: 589490.

Herbette S, Roeckel-Drevet P, Drevet JR, 2007. Seleno-independent glutathione peroxidases. *FEBS Journal* **274**: 2163–2180.

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

Herrero E, Ros J, Bellí G, Cabiscol E, 2008. Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1780**: 1217–1235.

Hickey PW, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Wickes BL, Schmidt HJ, Walsh TJ, 2009. *Trichosporon mycotoxinivorans*, a novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **47**: 3091–3097.

Hill DT, Sutton BM, Lantos I, 1978. Method for preparing auranofin. US 4200783A.

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

Hokai Y, Jurkowicz B, Fernández-Gallardo J, Zakirkhodjaev N, Sanaú M, Muth TR, Contel M, 2014. Auranofin and related heterometallic gold(I)-thiolates as potent inhibitors of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* bacterial strains. *Journal of Inorganic Biochemistry* **138**: 81–88.

Holdom MD, Hay RJ, Hamilton AJ, 1996. The Cu,Zn superoxide dismutases of *Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus nidulans*, and *Aspergillus terreus*: purification and biochemical comparison with the *Aspergillus fumigatus* Cu,Zn superoxide dismutase. *Infection and Immunity* **64**: 3326–3332.

Holle J, Leichsenring M, Meissner PE, 2014. Nebulized voriconazole in infections with *Scedosporium apiospermum*--case report and review of the literature. *Journal of Cystic Fibrosis* **13**: 400–402.

Holmgren A, 1989. Thioredoxin and glutaredoxin systems. *The Journal of Biological Chemistry* **264**: 13963–13966.

Holmgren A, Johansson C, Berndt C, Lönn ME, Hudemann C, Lillig CH, 2005. Thiol redox control via thioredoxin and glutaredoxin systems. *Biochemical Society Transactions* **33**: 1375–1377.

Holmgren A, Lu J, Vlamis-Gardikas A, Zhao R, Kandasamy K, Engman L, Engstrand L, Hoffner S 2013. Bacterial thioredoxin reductase inhibitors and methods for use thereof. US 8592468.

Homa M, Galgóczy L, Tóth E, Tóth L, Papp T, Chandrasekaran M, Kadaikunnan S, Alharbi NS, Vágvölgyi C, 2015. *In vitro* antifungal activity of antipsychotic drugs and their combinations with conventional antifungals against *Scedosporium* and *Pseudallescheria* isolates. *Medical Mycology* **53**: 890–895.

Hong G, Miller HB, Allgood S, Lee R, Lechtzin N, Zhang SX, 2017a. Use of selective fungal culture media increases rates of detection of fungi in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology* **55**: 1122–1130.

Hong G, White M, Lechtzin N, West NE, Avery R, Miller H, Lee R, Lovari RJ, Massire C, Blyn LB, Liang X, Sutton DA, Fu J, Wickes BL, Wiederhold NP, Zhang SX, 2017b. Fatal disseminated *Rasamsonia* infection in cystic fibrosis post-lung transplantation. *Journal of Cystic Fibrosis* **16**: e3–e7.

Hopper M, Yun J-F, Zhou B, Le C, Kehoe K, Le R, Hill R, Jongeward G, Debnath A, Zhang L, Miyamoto Y, Eckmann L, Land KM, Wrischnik LA, 2016. Auranofin inactivates *Trichomonas vaginalis* thioredoxin reductase and is effective against trichomonads in vitro and in vivo. *International Journal of Antimicrobial Agents* **48**: 690–694.

Hopwood V, Evans EG, Matthews J, Denning DW, 1995. *Scedosporium prolificans*, a multi-resistant fungus, from a U.K. AIDS patient. *The Journal of Infection* **30**: 153–155.

Horré R, Lackner M, Buzina W, Tintelnot K, 2010. Near-drowning and cerebral infections caused by fungi belonging to the *Pseudallescheria / Scedosporium* complex. *Anasthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie: AINS* **45**: 152–158.

Horré R, Marklein G, 2009. Isolation and clinical significance of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species. *Medical Mycology* **47**: 415–421.

Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Reiffert S-M, 2011. Detection of hyphomycetes in the upper respiratory tract of patients with cystic fibrosis. *Mycoses* **54**: 514–522.

Horré R, Schaal KP, Siekmeier R, Sterzik B, de Hoog GS, Schnitzler N, 2004. Isolation of fungi, especially *Exophiala dermatitidis*, in patients suffering from cystic fibrosis. A prospective study. *Respiration* **71**: 360–366.

Houbraken J, Giraud S, Meijer M, Bertout S, Frisvad JC, Meis JF, Bouchara JP, Samson RA, 2013. Taxonomy and antifungal susceptibility of clinically important *Rasamsonia* species. *Journal of Clinical Microbiology* **51**: 22–30.

Howard SJ, Cerar D, Anderson MJ, Albarrag A, Fisher MC, Pasqualotto AC, Laverdiere M, Arendrup MC, Perlin DS, Denning DW, 2009. Frequency and evolution of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* associated with treatment failure. *Emerging Infectious Diseases* **15**: 1068–1076.

Howard SJ, Harrison E, Bowyer P, Varga J, Denning DW, 2011. Cryptic species and azole resistance in the *Aspergillus niger* complex. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **55**: 4802–4809.

Howard SJ, Webster I, Moore CB, Gardiner RE, Park S, Perlin DS, Denning DW, 2006. Multi-azole resistance in *Aspergillus fumigatus*. *International Journal of Antimicrobial Agents* **28**: 450–453.

Hudson AL, Sotirchos IM, Davey MW, 2010. Substrate specificity of the mitochondrial thioredoxin reductase of the parasitic nematode *Haemonchus contortus*. *Parasitology Research* **107**: 487–493.

Hugnet C, Marrou B, Dally C, Guillot J, 2009. Osteomyelitis and discospondylitis due to *Scedosporium apiospermum* in a dog. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation* **21**: 120–123.

Huguenin A, Noel V, Rogez A, Chemla C, Villena I, Toubas D, 2015. *Scedosporium apiospermum* otitis complicated by a temporomandibular arthritis: A case report and mini-review. *Mycopathologia* **180**: 257–264.

Hull J, Vervaart P, Grimwood K, Phelan P, 1997. Pulmonary oxidative stress response in young children with cystic fibrosis. *Thorax* **52**: 557–560.

Husain S, Muñoz P, Forrest G, Alexander BD, Somani J, Brennan K, Wagener MM, Singh N, 2005. Infections due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium prolificans* in transplant recipients: clinical characteristics and impact of antifungal agent therapy on outcome. *Clinical Infectious Diseases* **40**: 89–99.

Hwang C-S, Baek Y-U, Yim H-S, Kang S-O, 2003. Protective roles of mitochondrial manganese-containing superoxide dismutase against various stresses in *Candida albicans*. *Yeast* **20**: 929–941.

Hwang C-S, Rhie G, Kim S-T, Kim Y-R, Huh W-K, Baek Y-U, Kang S-O, 1999. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase and its gene from *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1427**: 245–255.

Hwang C-S, Rhie G, Oh J-H, Huh W-K, Yim H-S, Kang S-O, 2002. Copper- and zinc-containing superoxide dismutase (Cu/ZnSOD) is required for the protection of *Candida albicans* against oxidative stresses and the expression of its full virulence. *Microbiology* **148**: 3705–3713.

Idigoras P, Pérez-Trallero E, Piñeiro L, Larruskain J, López-Lopategui MC, Rodríguez N, González JM, 2001. Disseminated infection and colonization by *Scedosporium prolificans*: a review of 18 cases, 1990–1999. *Clinical Infectious Diseases* **32**: e158–e165.

Ilari A, Baiocco P, Messori L, Fiorillo A, Boffi A, Gramiccia M, Di Muccio T, Colotti G, 2012. A gold-containing drug against parasitic polyamine metabolism: the X-ray structure of trypanothione reductase from *Leishmania infantum* in complex with auranofin reveals a dual mechanism of enzyme inhibition. *Amino Acids* **42**: 803–811.

Iovine NM, Pursnani S, Voldman A, Wasserman G, Blaser MJ, Weinrauch Y, 2008. Reactive nitrogen species contribute to innate host defense against *Campylobacter jejuni*. *Infection and Immunity* **76**: 986–993.

Jackson-Rosario S, Cowart D, Myers A, Tarrien R, Levine RL, Scott RA, Self WT, 2009. Auranofin disrupts selenium metabolism in *Clostridium difficile* by forming a stable Au-Se adduct. *Journal of biological inorganic chemistry* **14**: 507–519.

Jain C, Pastor K, Gonzalez AY, Lorenz MC, Rao RP, 2013. The role of *Candida albicans* AP-1 protein against host derived ROS in in vivo models of infection. *Virulence* **4**: 67–76.

Jain C, Yun M, Politz SM, Rao RP, 2009. A pathogenesis assay using *Saccharomyces cerevisiae* and *Caenorhabditis elegans* reveals novel roles for yeast AP-1, Yap1, and host dual oxidase BLI-3 in fungal pathogenesis. *Eukaryotic Cell* **8**: 1218–1227.

Janahi IA, Rehman A, Al-Naimi AR, 2017. Allergic bronchopulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *Annals of Thoracic Medicine* **12**: 74–82.

Janda-Ulfig K, Ulfig K, Cano J, Guarro J, 2008. A study of the growth of *Pseudallescheria boydii* isolates from sewage sludge and clinical sources on tributyrin, rapeseed oil, biodiesel oil and diesel oil. *Annals of agricultural and environmental medicine* **15**: 45–49.

Jimenez AL, Salvo NL, 2011. Mycetoma or synovial sarcoma? A case report with review of the literature. *The Journal of Foot and Ankle Surgery* **50**: 569–576.

Joice AC, Harris MT, Kahney EW, Dodson HC, Maselli AG, Whitehead DC, Morris JC, 2013. Exploring the mode of action of ebselen in *Trypanosoma brucei* hexokinase inhibition. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance* **3**: 154–160.

Joubert A, Calmes B, Berruyer R, Pihet M, Bouchara JP, Simoneau P, Guillemette T, 2010. Laser nephelometry applied in an automated microplate system to study filamentous fungus growth. *Biotechniques* **48**: 399–404.

Jouret F, Courtoy PJ, Devuyst O, 2011. Segmental and subcellular distribution of CFTR in the kidney. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* **741**: 285–299.

Kaltseis J, Rainer J, De Hoog GS, 2009. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. *Medical Mycology* **47**: 398–405.

Kanj SS, Tapson V, Davis RD, Madden J, Browning I, 1997. Infections in patients with cystic fibrosis following lung transplantation. *Chest* **112**: 924–930.

Kantarcioglu AS, Guarro J, de Hoog GS, 2008. Central nervous system infections by members of the *Pseudallescheria boydii* species complex in healthy and immunocompromised hosts: epidemiology, clinical characteristics and outcome. *Mycoses* **51**: 275–290.

Kantarcioglu AS, de Hoog GS, Guarro J, 2012. Clinical characteristics and epidemiology of pulmonary pseudallescheriasis. *Revista Iberoamericana De Micologia* **29**: 1–13.

Katragkou A, Dotis J, Kotsiou M, Tamiolaki M, Roilides E, 2007. *Scedosporium apiospermum* infection after near-drowning. *Mycoses* **50**: 412–421.

Kaufman L, Standard PG, Jalbert M, Kraft DE, 1997. Immunohistologic identification of *Aspergillus spp.* and other hyaline fungi by using polyclonal fluorescent antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* **35**: 2206–2209.

Kaur J, Duan SY, Vaas LA, Penesyan A, Meyer W, Paulsen IT, Nevalainen H, 2015. Phenotypic profilin of *Scedosporium aurantiacum,* an opportunistic pathogen colonizing human lungs. PloS One **10:** e0122354.

Kaur R, Katariya P, Dhakad MS, Mehra B, Jhamb U, Dubey AP, 2016. An unusual case of cystic fibrosis associated *Pneumocystis jiroveci* pneumonia in an infant. *Case Reports in Infectious Diseases* **2016**: 9206707.

Kavitha S, Chandra TS, 2014. Oxidative stress protection and glutathione metabolism in response to hydrogen peroxide and menadione in riboflavinogenic fungus *Ashbya gossypii*. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **174**: 2307–2325.

Kepez Yildiz B, Hasanreisoglu M, Aktas Z, Aksu G, Kocak BC, Akata F, 2014. Fungal keratitis secondary to *Scedosporium apiospermum* infection and successful treatment with surgical and medical intervention. *International Ophthalmology* **34**: 305–308.

Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC, 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* **245**: 1073–1080.

Kiffer-Moreira T, Pinheiro AAS, Pinto MR, Esteves FF, Souto-Padrón T, Barreto-Bergter E, Meyer-Fernandes JR, 2007. Mycelial forms of *Pseudallescheria boydii* present ectophosphatase activities. *Archives of Microbiology* **188**: 159–166.

Kim JH, Chan KL, Faria NCG, Martins M de L, Campbell BC, 2012a. Targeting the oxidative stress response system of fungi with redox-potent chemosensitizing agents. *Frontiers in Microbiology* **3**: 88.

Kim JH, Faria NCG, Martins MDL, Chan KL, Campbell BC, 2012b. Enhancement of antimycotic activity of amphotericin B by targeting the oxidative stress response of *Candida* and *Cryptococcus* with natural dihydroxybenzaldehydes. *Frontiers in Microbiology* **3**: 261.

King J, Brunel SF, Warris A, 2016. *Aspergillus* infections in cystic fibrosis. *Journal of Infection* **72**: S50–S55.

Kiratli H, Uzun O, Kiraz N, Eldem B, 2001. *Scedosporium apiospermum* chorioretinitis. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* **79**: 540–542.

Klotz MG, Klassen GR, Loewen PC, 1997. Phylogenetic relationships among prokaryotic and eukaryotic catalases. *Molecular Biology and Evolution* **14**: 951–958.

Knowles MR, Stutts MJ, Spock A, Fischer N, Gatzy JT, Boucher RC, 1983. Abnormal ion permeation through cystic fibrosis respiratory epithelium. *Science* **221**: 1067–1070.

Kochenburger J, Eriksson C, Greenberg M, Hoyt L, 2017. Ultrasonography of a ureteral and bladder fungal granuloma caused by *Scedosporium apiospermum* in a basset hound. *Veterinary Radiology and Ultrasound*.

Koehler P, Tacke D, Cornely OA, 2016. Bone and joint infections by *Mucorales, Scedosporium, Fusarium* and even rarer fungi. *Critical Reviews in Microbiology* **42**: 158–171.

Komalapriya C, Kaloriti D, Tillmann AT, Yin Z, Herrero-de-Dios C, Jacobsen MD, Belmonte RC, Cameron G, Haynes K, Grebogi C, de Moura APS, Gow NAR, Thiel M, Quinn J, Brown AJP, Romano MC, 2015. Integrative model of oxidative stress adaptation in the fungal pathogen *Candida albicans*. *PLoS One* **10** (9):e0137750.

Kondori N, Gilljam M, Lindblad A, Jönsson B, Moore ERB, Wennerås C, 2011. High rate of *Exophiala dermatitidis* recovery in the airways of patients with cystic fibrosis is associated with pancreatic insufficiency. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 1004–1009.

Kontou M, Will RD, Adelfalk C, Wittig R, Poustka A, Hirsch-Kauffmann M, Schweiger M, 2004. Thioredoxin, a regulator of gene expression. *Oncogene* **23**: 2146–2152.

Kooijman CM, Kampinga GA, de Hoog GS, Goudswaard WB, Reijnen MMPJ, 2007. Successful treatment of *Scedosporium aurantiacum* osteomyelitis in an immunocompetent patient. *Surgical Infections* **8**: 605–610.

Kos I, Patterson MJ, Znaidi S, Kaloriti D, da Silva Dantas A, Herrero-de-Dios CM, d'Enfert C, Brown AJP, Quinn J, 2016. Mechanisms underlying the delayed activation of the Cap1 transcription factor in *Candida albicans* following combinatorial oxidative and cationic stress important for phagocytic potency. *mBio* **7**: e00331.

Kovacicova G, Hanzen J, Pisarcikova M, Sejnova D, Horn J, Babela R, Svetlansky I, Lovaszova M, Gogova M, Krcmery V, 2001. Nosocomial fungemia due to amphotericin B-resistant *Candida spp.* in three pediatric patients after previous neurosurgery for brain tumors. *Journal of Infection and Chemotherapy* **7**: 45–48.

Kramer R, Sauer-Heilborn A, Welte T, Guzman CA, Abraham W-R, Höfle MG, 2015. Cohort study of airway mycobiome in adult cystic fibrosis patients: differences in community structure between fungi and bacteria reveal predominance of transient fungal elements. *Journal of Clinical Microbiology* **53**: 2900–2907.

Krappmann S, Sasse C, Braus GH, 2006. Gene targeting in *Aspergillus fumigatus* by homologous recombination is facilitated in a nonhomologous end- joining-deficient genetic background. *Eukaryotic Cell* **5**: 212–215.

Kreda SM, Davis CW, Rose MC, 2012. CFTR, mucins, and mucus obstruction in cystic fibrosis. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**.

Kreda SM, Mall M, Mengos A, Rochelle L, Yankaskas J, Riordan JR, Boucher RC, 2005. Characterization of wild-type and deltaF508 cystic fibrosis transmembrane regulator in human respiratory epithelia. *Molecular Biology of the Cell* **16**: 2154–2167.

Krnajski Z, Gilberger T-W, Walter RD, Cowman AF, Müller S, 2002. Thioredoxin reductase is essential for the survival of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages. *The Journal of Biological Chemistry* **277**: 25970–25975.

Kröner C, Kappler M, Grimmelt A-C, Laniado G, Würstl B, Griese M, 2013. The basidiomycetous yeast *Trichosporon* may cause severe lung exacerbation in cystic fibrosis patients - clinical analysis of Trichosporon positive patients in a Munich cohort. *BMC Pulmonary Medicine* **13**: 61.

Kumar A, Ahmed R, Singh PK, Shukla PK, 2011. Identification of virulence factors and diagnostic markers using immunosecretome of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Proteomics* **74**: 1104–1112.

Kumar BS, Tiwari SK, Saikant R, Manoj G, Kunwar A, Sivaram G, Abid Z, Ahmad A, Priyadarsini KI, Khan AA, 2010. Antibacterial and ulcer healing effects of organoselenium compounds in naproxen induced and *Helicobacter pylori* infected Wistar rat model. *Journal of trace elements in medicine and biology* **24**: 263–270.

Kuntz AN, Davioud-Charvet E, Sayed AA, Califf LL, Dessolin J, Arnér ESJ, Williams DL, 2007. Thioredoxin glutathione reductase from *Schistosoma mansonii*: an essential parasite enzyme and a key drug target. *PLoS medicine* **4**: e206.

Kusch H, Engelmann S, Albrecht D, Morschhäuser J, Hecker M, 2007. Proteomic analysis of the oxidative stress response in *Candida albicans*. *Proteomics* **7**: 686–697.

Kusenbach G, Skopnik H, Haase G, Friedrichs F, Döhmen H, 1992. *Exophiala dermatitidis* pneumonia in cystic fibrosis. *European Journal of Pediatrics* **151**: 344–346.

Kurup VP, Banerjee B, Hemmann S, Greenberger PA, Blaser K, Crameri R, 2000. Selected recombinant *Aspergillus fumigatus* allergens bind specifically to IgE in ABPA. *Clinical & Experimental Allergy* **30:** 988-993.

Labbé F, Babchia S, Evreux F, Chenal P, 2013. Isolation of *Geosmithia argillacea* in a cystic fibrosis patient. *Journal De Mycologie Medicale* **23**: 176–178.

Labombarda F, Saloux E, Brouard J, Bergot E, Milliez P, 2016. Heart involvement in cystic fibrosis: A specific cystic fibrosis-related myocardial changes? *Respiratory Medicine* **118**: 31–38.

Lackner M, De Man FH, Eygendaal D, Wintermans RGF, Kluytmans JA, Klaassen CH, Meis JF, 2011a. Severe prosthetic joint infection in an immunocompetent male patient due to a therapy refractory *Pseudallescheria apiosperma*. *Mycoses* **54 Suppl 3**: 22–27.

Lackner M, Fernández-Silva F, Guarro J, Lass-Flörl C, 2014a. Assessing micafungin/triazole combinations for the treatment of invasive scedosporiosis due to *Scedosporium apiospermum* and *Scedosporium boydii*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **69**: 3027–3032.

Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, Meis JF, 2012. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **56**: 2635–2642.

Lackner M, Hoog GS de, Yang L, Moreno LF, Ahmed SA, Andreas F, Kaltseis J, Nagl M, Lass-Flörl C, Risslegger B, Rambach G, Speth C, Robert V, Buzina W, Chen S, Bouchara JP, Cano-Lira JF, Guarro J, Gené J, Silva FF, Haido R, Haase G, Havlicek V, Garcia-Hermoso D, Meis JF, Hagen F, Kirchmair M, Rainer J, Schwabenbauer K, Zoderer M, Meyer W, Gilgado F, Schwabenbauer K, Vicente VA, Piecková E, Regenermel M, Rath P-M, Steinmann J, Alencar XW de, Symoens F, Tintelnot K, Ulfig K, Velegraki A, Tortorano AM, Giraud S, Mina S, Rigler-Hohenwarter K, Hernando FL, Ramirez-Garcia A, Pellon A, Kaur J, Bergter EB, Meirelles JV de, Silva ID da, Delhaes L, Alastruey-Izquerdo A, Li R, Lu Q, Moussa T, Almaghrabi O, Al-Zahrani H, Okada G, Deng S, Liao W, Zeng J, Issakainen J, Lopes LCL, 2014b. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria, Scedosporium* and related genera. *Fungal Diversity* **67**: 1–10.

Lackner M, Rezusta A, Villuendas MC, Palacian MP, Meis JF, Klaassen CH, 2011b. Infection and colonisation due to *Scedosporium* in Northern Spain. An *in vitro* antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates. *Mycoses* **54 Suppl 3**: 12–21.

Lake FR, Tribe AE, McAleer R, Froudist J, Thompson PJ, 1990. Mixed allergic bronchopulmonary fungal disease due to Pseudallescheria boydii and Aspergillus. *Thorax* **45**: 489–491.

Lambou K, Lamarre C, Beau R, Dufour N, Latgé JP, 2010. Functional analysis of the superoxide dismutase family in *Aspergillus fumigatus*. *Molecular Microbiology* **75**: 910–923.

Lancaster JR, Vega JM, Kamin H, Orme-Johnson NR, Orme-Johnson WH, Krueger RJ, Siegel LM, 1979. Identification of the iron-sulfur center of spinach ferredoxin-nitrite reductase as a tetranuclear center, and preliminary EPR studies of mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* **254**: 1268–1272.

Larcher G, Cimon B, Symoens F, Tronchin G, Chabasse D, Bouchara JP, 1996. A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. *Biochemical Journal* **315**: 119–126.

Lass-Flörl C, Cuenca-Estrella M, 2017. Changes in the epidemiological landscape of invasive mould infections and disease. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **72**: i5–i11.

Laugero C, Tillier D, 2008. Procédé de traitement biologique d'effluent d'élevage et le dispositif pour la mise en oeuvre de ce procédé.

Lavergne R-A, Morio F, Favennec L, Dominique S, Meis JF, Gargala G, Verweij PE, Le Pape P, 2015. First description of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation in France. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **59**: 4331–4335.

Leal SM, Vareechon C, Cowden S, Cobb BA, Latgé JP, Momany M, Pearlman E, 2012. Fungal antioxidant pathways promote survival against neutrophils during infection. *Journal of Clinical Investigation* **122**: 2482–2498.

Lebecque P, Leonard A, Huang D, Reychler G, Boeras A, Leal T, Symoens F, 2010. *Exophiala (Wangiella) dermatitidis* and cystic fibrosis - Prevalence and risk factors. *Medical Mycology* **48 Suppl 1**: S4-9.

Lee J, Godon C, Lagniel G, Spector D, Garin J, Labarre J, Toledano MB, 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **274**: 16040–16046.

Leitsch D, Müller J, Müller N, 2016. Evaluation of *Giardia lamblia* thioredoxin reductase as drug activating enzyme and as drug target. *International Journal for Parasitology. Drugs and Drug Resistance* **6**: 148–153.

Lelièvre B, Legras P, Godon C, Franconi F, Saint-André JP, Bouchara JP, Diquet B, 2013. Experimental models of disseminated scedosporiosis with cerebral involvement. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **345**: 198–205.

Leperlier D, Vallefuoco R, Laloy E, Debeaupuits J, De Fornel Thibaud P, Crespeau F-L, Guillot J, 2010. Fungal rhinosinusitis caused by *Scedosporium apiospermum* in a cat. *Journal of Feline Medicine and Surgery* **12**: 967–971.

Le Gal S, Héry-Arnaud G, Ramel S, Virmaux M, Damiani C, Totet A, Nevez G, 2010. *Pneumocystis jirovecii* and cystic fibrosis in France. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **42**: 225–227.

Lessing F, Kniemeyer O, Wozniok I, Loeffler J, Kurzai O, Haertl A, Brakhage AA, 2007. The *Aspergillus fumigatus* transcriptional regulator *AfYap1* represents the major regulator for defense against reactive oxygen intermediates but is dispensable for pathogenicity in an intranasal mouse infection model. *Eukaryotic Cell* **6**: 2290–2302.

Lev S, Hadar R, Amedeo P, Baker SE, Yoder OC, Horwitz BA, 2005. Activation of an AP1-like transcription factor of the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus* in response to oxidative stress and plant signals. *Eukaryotic Cell* **4**: 443–454.

Lévêque M, Trionnaire SL, Porto PD, Martin-Chouly C, 2017. The impact of impaired macrophage functions in cystic fibrosis disease progression. *Journal of Cystic Fibrosis* **16**: 443–453.

Lezo A, Biasi F, Massarenti P, Calabrese R, Poli G, Santini B, Bignamini E, 2013. Oxidative stress in stable cystic fibrosis patients: do we need higher antioxidant plasma levels? *Journal of Cystic Fibrosis* **12**: 35–41.

Li X, Wu Y, Liu Z, Zhang C, 2017. The function and transcriptome analysis of a bZIP transcription factor *Cg*AP1 in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbiological Research* **197**: 39–48.

Lin C-H, Yang SL, Chung K-R, 2009. The YAP1 homolog-mediated oxidative stress tolerance is crucial for pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in citrus. *Molecular plant-microbe interactions* **22**: 942–952.

Lin C-H, Yang SL, Chung K-R, 2011. Cellular responses required for oxidative stress tolerance, colonization, and lesion formation by the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in citrus. *Current Microbiology* **62**: 807–815.

Linares CEB, Giacomelli SR, Altenhofen D, Alves SH, Morsch VM, Schetinger MRC, 2013. Fluconazole and amphotericin-B resistance are associated with increased catalase and superoxide dismutase activity in *Candida albicans* and *Candida dubliniensis*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* **46**: 752–758.

LiPuma JJ, 2010. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. *Clinical Microbiology Reviews* **23**: 299–323.

Liu G, Botting CH, Evans KM, Walton JAG, Xu G, Slawin AMZ, Westwood NJ, 2010. Optimisation of conoidin A, a peroxiredoxin inhibitor. *ChemMedChem* **5**: 41–45.

Liu Z, Friesen TL, 2012. Polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation in filamentous fungal pathogens. *Methods in Molecular Biology* **835**: 365–375.

Liu L, Zeng M, Hausladen A, Heitman J, Stamler JS, 2000. Protection from nitrosative stress by yeast flavohemoglobin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 4672–4676.

López-Cruz J, Óscar C-S, Emma F-C, Pilar G-A, Carmen G-B, 2017. Absence of Cu-Zn superoxide dismutase BCSOD1 reduces *Botrytis cinerea* virulence in *Arabidopsis* and tomato plants, revealing interplay among reactive oxygen species, callose and signalling pathways. *Molecular Plant Pathology* **18**: 16–31.

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

Lu J, Holmgren A, 2014. The thioredoxin antioxidant system. *Free Radical Biology and Medicine* **66**: 75–87.

Lu J, Vlamis-Gardikas A, Kandasamy K, Zhao R, Gustafsson TN, Engstrand L, Hoffner S, Engman L, Holmgren A, 2013a. Inhibition of bacterial thioredoxin reductase: an antibiotic mechanism targeting bacteria lacking glutathione. *FASEB Journal* **27**: 1394–1403.

Lu J, Vodnala SK, Gustavsson A-L, Gustafsson TN, Sjöberg B, Johansson HA, Kumar S, Tjernberg A, Engman L, Rottenberg ME, Holmgren A, 2013b. Ebsulfur is a benzisothiazolone cytocidal inhibitor targeting the trypanothione reductase of Trypanosoma brucei. *The Journal of Biological Chemistry* **288**: 27456–27468.

Machado AK, Morgan BA, Merrill GF, 1997. Thioredoxin reductase-dependent inhibition of MCB cell cycle box activity in Saccharomyces cerevisiae. *The Journal of Biological Chemistry* **272**: 17045–17054.

Machouart M, Garcia-Hermoso D, Rivier A, Hassouni N, Catherinot E, Salmon A, Debourgogne A, Coignard H, Lecuit M, Bougnoux M-E, Blanche S, Lortholary O, 2011. Emergence of disseminated infections due to *Geosmithia argillacea* in patients with chronic granulomatous disease receiving long-term azole antifungal prophylaxis. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 1681–1683.

Mancini N, Ossi CM, Perotti M, Carletti S, Gianni C, Paganoni G, Matuska S, Guglielminetti M, Cavallero A, Burioni R, Rama P, Clementi M, 2005. Direct sequencing of *Scedosporium apiospermum* DNA in the diagnosis of a case of keratitis. *Journal of Medical Microbiology* **54**: 897–900.

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

Marcos AT, Ramos MS, Marcos JF, Carmona L, Strauss J, Cánovas D, 2016. Nitric oxide synthesis by nitrate reductase is regulated during development in *Aspergillus*. *Molecular Microbiology* **99**: 15–33.

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

Martchenko M, Alarco A-M, Harcus D, Whiteway M, 2004. Superoxide dismutases in *Candida albicans:* transcriptional regulation and functional characterization of the hyphal-induced SOD5 gene. *Molecular Biology of the Cell* **15**: 456–467.

Martínez Muñiz F de B, Martínez Redondo M, Prados Sánchez C, García Rodríguez J, 2016. Chronic lung infection caused by *Trichosporon mycotoxinivorans* and tricosporin mucoides in an immunocompetent cystic fibrosis patient. *Archivos De Bronconeumologia* **52**: 400.

Martínez-González JJ, Guevara-Flores A, Alvarez G, Rendón-Gómez JL, Del Arenal IP, 2010. In vitro killing action of auranofin on *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci) and inactivation of thioredoxin-glutathione reductase (TGR). *Parasitology Research* **107**: 227–231.

Martínez-González JJ, Guevara-Flores A, Rendón JL, del Arenal IP, 2015. Auranofin-induced oxidative stress causes redistribution of the glutathione pool in *Taenia crassiceps* cysticerci. *Molecular and Biochemical Parasitology* **201**: 16–25.

Martin-Vicente A, Guarro J, González GM, Lass-Flörl C, Lackner M, Capilla J, 2017. Voriconazole MICs are predictive for the outcome of experimental disseminated scedosporiosis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **72**: 1118–1122.

Maslen M, Peel M, 2011. Human and animal isolates of *Pseudallescheria boydii* and *Scedosporium* species, from Melbourne, Australia, 1977-1995. *Mycoses* **54**: 442–449.

Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W, 2014. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Medical Mycology* **52**: 179–186.

Matamoros MA, Saiz A, Peñuelas M, Bustos-Sanmamed P, Mulet JM, Barja MV, Rouhier N, Moore M, James EK, Dietz K-J, Becana M, 2015. Function of glutathione peroxidases in legume root nodules. *Journal of Experimental Botany* **66**: 2979–2990.

Matos T, Cerar T, Praprotnik M, Krivec U, Pirš M, 2015. First recovery of *Rasamsonia argillacea* species complex isolated in adolescent patient with cystic fibrosis in Slovenia--case report and review of literature. *Mycoses* **58**: 506–510.

McCowan C, Bibby S, Scott PC, 2014. Mycotic keratitis due to *Scedosporium apiospermum* in layer pullets. *Veterinary Ophthalmology* **17**: 63–66.

McGrath LT, Mallon P, Dowey L, Silke B, McClean E, McDonnell M, Devine A, Copeland S, Elborn S, 1999. Oxidative stress during acute respiratory exacerbations in cystic fibrosis. *Thorax* **54**: 518–523.

McKelvie PA, Wong EY, Chow LP, Hall AJ, 2001. *Scedosporium* endophthalmitis: two fatal disseminated cases of *Scedosporium* infection presenting with endophthalmitis. *Clinical and Experimental Ophthalmology* **29**: 330–334.

McLaren O, Potter C, 2016. *Scedosporium apiospermum*: a rare cause of malignant otitis externa. *BMJ case reports* **2016**.

Meletiadis J, Meis JFGM, Mouton JW, Rodriquez-Tudela JL, Donnelly JP, Verweij PE, 2002. *In vitro* activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **46**: 62–68.

Mellinghoff IK, Winston DJ, Mukwaya G, Schiller GJ, 2002. Treatment of *Scedosporium apiospermum* brain abscesses with posaconazole. *Clinical Infectious Diseases* **34**: 1648–1650.

Mello TP de, Aor AC, Oliveira SSC de, Branquinha MH, Santos ALSD, 2016. Conidial germination in *Scedosporium apiospermum, S. aurantiacum, S. minutisporum* and *Lomentospora prolificans*: influence of growth conditions and antifungal susceptibility profiles. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* **0**: 0.

Mesa-Arango AC, Trevijano-Contador N, Román E, Sánchez-Fresneda R, Casas C, Herrero E, Argüelles JC, Pla J, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O, 2014. The production of reactive oxygen species is a universal action mechanism of amphotericin B against pathogenic yeasts and contributes to the fungicidal effect of this drug. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **58**: 6627–6638.

Miller A-F, 2012. Superoxide dismutases: Ancient enzymes and new insights. *FEBS Letters* **586**: 585–595.

Miller MA, Greenberger PA, Amerian R, Toogood JH, Noskin GA, Roberts M, Patterson R, 1993. Allergic bronchopulmonary mycosis caused by *Pseudallescheria boydii*. *The American Review of Respiratory Disease* **148**: 810–812.

Mills GC, 1957. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *The Journal of Biological Chemistry* **229**: 189–197.

Mina S, Marot-Leblond A, Cimon B, Fleury MJJ, Larcher G, Bouchara JP, Robert R, 2015a. Purification and characterization of a mycelial catalase from *Scedosporium boydii*, a useful tool for specific antibody detection in patients with cystic fibrosis. *Clinical and Vaccine Immunology* **22**: 37–45.

Mina S, Staerck C, d'Almeida SM, Marot A, Delneste Y, Calenda A, abiasco J, Bouchara JP, Fleury MJJ. 2015b. Identification of *Scedosporium boydii* catalase A1 gene, a reactive oxygen species detoxification factor highly expressed in response to oxidative stress and phagocytic cells. *Fungal Biology* **119**: 1322–1333.

Miorelli ST, Rosa RM, Moura DJ, Rocha JC, Lobo LAC, Henriques JAP, Saffi J, 2008. Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. *Mutagenesis* **23**: 93–99.

Miramón P, Dunker C, Windecker H, Bohovych IM, Brown AJP, Kurzai O, Hube B, 2012. Cellular responses of *Candida albicans* to phagocytosis and the extracellular activities of neutrophils are critical to counteract carbohydrate starvation, oxidative and nitrosative stress. *PLoS One* **7** (12): e52850.

Missall TA, Lodge JK, 2005. Thioredoxin reductase is essential for viability in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Eukaryotic Cell* **4**: 487–489.

Missal TA, Lodge JK, McEwen JE, 2004. Mechanisms of resistance to oxidative and nitrosative stress implications for fungal survival in mammalien hosts. *Eukaryotic Cells* ***3*:** 835-846.

Missall TA, Pusateri ME, Lodge JK, 2004. Thiol peroxidase is critical for virulence and resistance to nitric oxide and peroxide in the fungal pathogen, *Cryptococcus neoformans*. *Molecular Microbiology* **51**: 1447–1458.

Mohan R, Gopakumar TS, 2016. Clinico-radiological improvement in an immunocompetent patient presented with *Scedosporium apiospermum* osteomyelitis. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma* **7**: 134–137.

Molina L, Kahmann R, 2007. An *Ustilago maydis* gene involved in H_2O_2 detoxification is required for virulence. *The Plant Cell* **19**: 2293–2309.

Molnar O, Schatzmayr G, Fuchs E, Prillinger H, 2004. *Trichosporon mycotoxinivorans sp. nov.*, a new yeast species useful in biological detoxification of various mycotoxins. *Systematic and Applied Microbiology* **27**: 661–671.

Montagna MT, Caggiano G, Lovero G, De Giglio O, Coretti C, Cuna T, Iatta R, Giglio M, Dalfino L, Bruno F, Puntillo F, 2013. Epidemiology of invasive fungal infections in the intensive care unit: results of a multicenter Italian survey (AURORA Project). *Infection* **41**: 645–653.

Montes-Cano MA, de la Horra C, Dapena FJ, Mateos I, Friaza V, Respaldiza N, Muñoz-Lobato F, Medrano FJ, Calderon EJ, Varela JM, 2007. Dynamic colonisation by different *Pneumocystis jirovecii* genotypes in cystic fibrosis patients. *Clinical Microbiology and Infection* **13**: 1008–1011.

Montibus M, Ducos C, Bonnin-Verdal M-N, Bormann J, Ponts N, Richard-Forget F, Barreau C, 2013. The bZIP transcription factor *Fg*ap1 mediates oxidative stress response and trichothecene biosynthesis but not virulence in *Fusarium graminearum*. *PloS One* **8**(12): e83377.

Morales MM, Falkenstein D, Lopes AG, 2000. The Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator (CFTR) in the kidney. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* **72**: 399–406.

Morio F, Aubin GG, Danner-Boucher I, Haloun A, Sacchetto E, Garcia-Hermoso D, Bretagne S, Miègeville M, Le Pape P, 2012. High prevalence of triazole resistance in *Aspergillus fumigatus*, especially mediated by TR/L98H, in a French cohort of patients with cystic fibrosis. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **67**: 1870–1873.

Morio F, Horeau-Langlard D, Gay-Andrieu F, Talarmin JP, Haloun A, Treilhaud M, Despins P, Jossic F, Nourry L, Danner-Boucher I, Pattier S, Bouchara JP, Le Pape P, Miègeville M, 2010. Disseminated *Scedosporium/Pseudallescheria* infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **48**: 1978–1982.

Mortensen KL, Jensen RH, Johansen HK, Skov M, Pressler T, Howard SJ, Leatherbarrow H, Mellado E, Arendrup MC, 2011a. *Aspergillus* species and other molds in respiratory samples from patients with cystic fibrosis: a laboratory-based study with focus on *Aspergillus fumigatus* azole resistance. *Journal of Clinical Microbiology* **49**: 2243–2251.

Mortensen KL, Johansen HK, Fuursted K, Knudsen JD, Gahrn-Hansen B, Jensen RH, Howard SJ, Arendrup MC, 2011b. A prospective survey of *Aspergillus* spp. in respiratory tract samples: prevalence, clinical impact and antifungal susceptibility. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **30**: 1355–1363.

Mouhajir A, Matray O, Giraud S, Mély L, Marguet C, Sermet-Gaudelus I, Le Gal S, Labbé F, Person C, Troussier F, Ballet J-J, Gargala G, Zouhair R, Bougnoux M-E, Bouchara JP, Favennec L, 2016. Long-term *Rasamsonia*

argillacea complex species colonization revealed by PCR amplification of repetitive DNA sequences in cystic fibrosis patients. *Journal of Clinical Microbiology* **54**: 2804–2812.

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

Müller S, Gilberger TW, Krnajski Z, Lüersen K, Meierjohann S, Walter RD, 2001. Thioredoxin and glutathione system of malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Protoplasma* **217**: 43–49.

Munck A, 2005. Atteinte digestive de la mucoviscidose chez l'enfant. *Médecine thérapeutique / Pédiatrie* **8**: 197–203.

Musk M, Chambers D, Chin W, Murray R, Gabbay E, 2006. Successful treatment of disseminated scedosporium infection in 2 lung transplant recipients: review of the literature and recommendations for management. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **25**: 1268–1272.

Muthig M, Hebestreit A, Ziegler U, Seidler M, Müller F-MC, 2010. Persistence of *Candida* species in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. *Medical Mycology* **48**: 56–63.

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

Nakamura Y, Suzuki N, Nakajima Y, Utsumi Y, Murata O, Nagashima H, Saito H, Sasaki N, Fujimura I, Ogino Y, Kato K, Terayama Y, Miyamoto S, Yarita K, Kamei K, Nakadate T, Endo S, Shibuya K, Yamauchi K, 2013. *Scedosporium aurantiacum* brain abscess after near-drowning in a survivor of a tsunami in Japan. *Respiratory Investigation* **51**: 207–211.

Narasipura SD, Ault JG, Behr MJ, Chaturvedi V, Chaturvedi S, 2003. Characterization of Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene knock-out mutant of *Cryptococcus neoformans var. gattii*: role in biology and virulence. *Molecular Microbiology* **47**: 1681–1694.

Narasipura SD, Chaturvedi V, Chaturvedi S, 2005. Characterization of *Cryptococcus neoformans variety gattii* SOD2 reveals distinct roles of the two superoxide dismutases in fungal biology and virulence. *Molecular Microbiology* **55**: 1782–1800.

Nathan C, Shiloh MU, 2000. Reactive oxygen and nitrogen intermediates in the relationship between mammalian hosts and microbial pathogens. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**: 8841–8848.

Nayak T, Szewczyk E, Oakley CE, Osmani A, Ukil L, Murray SL, Hynes MJ, Osmani SA, Oakley BR, 2006. A versatile and efficient gene-targeting system for *Aspergillus nidulans*. *Genetics* **172**: 1557–1566.

Nenoff P, Gütz U, Tintelnot K, Bosse-Henck A, Mierzwa M, Hofmann J, Horn LC, Haustein UF, 1996. Disseminated mycosis due to *Scedosporium prolificans* in an AIDS patient with Burkitt lymphoma. *Mycoses* **39**: 461–465.

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

Nevez G, Robert-Gangneux F, Pougnet L, Virmaux M, Belleguic C, Deneuville E, Rault G, Chevrier S, Ramel S, Le Bihan J, Guillaud-Saumur T, Calderon E, Le Govic Y, Gangneux JP, Le Gal S, 2017. *Pneumocystis jirovecii* and Cystic Fibrosis in Brittany, France. *Mycopathologia* Jul 7. doi: 10.1007/s11046-017-0172-2.

Newton EJW, 2012. *Scedosporium apiospermum* keratomycosis in a dog. *Veterinary Ophthalmology* **15**: 417–420.

Ngo HX, Shrestha SK, Garneau-Tsodikova S, 2016a. Identification of ebsulfur analogues with broad-spectrum antifungal activity. *ChemMedChem* **11**: 1507–1516.

Ngo HX, Shrestha SK, Green KD, Garneau-Tsodikova S, 2016b. Development of ebsulfur analogues as potent antibacterials against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **24**: 6298–6306.

Nguyen JB, Pool CD, Wong CYB, Treger RS, Williams DL, Cappello M, Lea WA, Simeonov A, Vermeire JJ, Modis Y, 2013. Peroxiredoxin-1 from the human hookworm *Ancylostoma ceylanicum* forms a stable oxidized decamer and is covalently inhibited by conoidin A. *Chemistry and Biology* **20**: 991–1001.

Nichols DP, Chmiel JF, 2015. Inflammation and its genesis in cystic fibrosis. *Pediatric Pulmonology* **50 Suppl 40**: S39-56.

Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H, 2004. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 12248–12253.

Nozawa R, Yokota T, Fujimoto T, 1989. Susceptibility of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* to the selenium-containing compound 2-phenyl-1,2-benzoisoselenazol-3(2H)-one (PZ51). *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **33**: 1388–1390.

Nweze EI, Okafor JI, 2010. *In vitro* activity of conventional antifungal agents against *Scedosporium apiospermum* isolates recovered from clinical and environmental samples in Nigeria. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* **57**: 209–214.

Ochiai N, Shimazaki C, Uchida R, Fuchida S-I, Okano A, Ashihara E, Inaba T, Fujita N, Nakagawa M, 2003. Disseminated infection due to *Scedosporium apiospermum* in a patient with acute myelogenous leukemia. *Leukemia and Lymphoma* **44**: 369–372.

Oliveira F de M, Unis G, Hochhegger B, Severo LC, 2013. *Scedosporium apiospermum* eumycetoma successfully treated with oral voriconazole: report of a case and review of the Brazilian reports on scedosporiosis. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **55**: 121–123.

Orian L, Toppo S, 2014. Organochalcogen peroxidase mimetics as potential drugs: a long story of a promise still unfulfilled. *Free Radical Biology and Medicine* **66**: 65–74.

Orie NN, Warren AR, Basaric J, Lau-Cam C, Piętka-Ottlik M, Młochowski J, Billack B, 2017. *In vitro* assessment of the growth and plasma membrane H(+) -ATPase inhibitory activity of ebselen and structurally related selenium- and sulfur-containing compounds in *Candida albicans*. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology* **31**.

Owings JP, McNair NN, Mui YF, Gustafsson TN, Holmgren A, Contel M, Goldberg JB, Mead JR, 2016. Auranofin and N-heterocyclic carbene gold-analogs are potent inhibitors of the bacteria *Helicobacter pylori*. *FEMS microbiology letters* **363**. pii: fnw148.

Packeu A, Lebecque P, Rodriguez-Villalobos H, Boeras A, Hendrickx M, Bouchara JP, Symoens F, 2012. Molecular typing and antifungal susceptibility of *Exophiala* isolates from patients with cystic fibrosis. *Journal of Medical Microbiology* **61**: 1226–1233.

Palanisamy M, Venkatapathy N, Rajendran V, Shobana CS, 2015. Keratomycosis caused by *Graphium eumorphum* (Graphium State of *Scedosporium apiospermum*). *Journal of Clinical and Diagnostic Research* **9**: DD03-DD04.

Palenik B, Brahamsha B, Larimer FW, Land M, Hauser L, Chain P, Lamerdin J, Regala W, Allen EE, McCarren J, Paulsen I, Dufresne A, Partensky F, Webb EA, Waterbury J, 2003. The genome of a motile marine *Synechococcus*. *Nature* **424**: 1037–1042.

Paranjape SM, Mogayzel PJ, 2017. Cystic fibrosis in the era of precision medicine. *Paediatric Respiratory Reviews* Mar 9. pii: S1526-0542(17)30024-6.

Parize P, Billaud S, Bienvenu AL, Bourdy S, Pogam MA le, Reix P, Picot S, Robert R, Lortholary O, Bouchara JP, Durieu I, 2014. Impact of *Scedosporium apiospermum* complex seroprevalence in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **13**: 667–673.

Parize P, Boussaud V, Poinsignon V, Sitterlé E, Botterel F, Lefeuvre S, Guillemain R, Dannaoui E, Billaud EM, 2017. Clinical outcome of cystic fibrosis patients colonized by *Scedosporium* species following lung transplantation: A single-center 15-year experience. *Transplant Infectious Diseases* Jun 15. doi: 10.1111/tid.12738.

Park J-B, Clark DS, 2006. New reaction system for hydrocarbon oxidation by chloroperoxidase. *Biotechnology and Bioengineering* **94**: 189–192.

Park M-S, Kim H-J, Park AR, Ahn K, Lim H-W, Lim C-J, 2012. Pap1p-dependent upregulation of thioredoxin 3 and thioredoxin reductase genes from the fission yeast under nitrosative stress. *Canadian Journal of Microbiology* **58**: 206–211.

Park NS, Lee KS, Sohn HD, Kim DH, Lee SM, Park E, Kim I, Je YH, Jin BR, 2005. Molecular cloning, expression, and characterization of the Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1) gene from the entomopathogenic fungus *Cordyceps militaris*. *Mycologia* **97**: 130–138.

Parker MW, Blake CCF, 1988. Crystal structure of manganese superoxide dismutase from *Bacillus stearothermophilus* at 2.4 Å resolution. *Journal of Molecular Biology* **199**: 649–661.

Parsonage D, Sheng F, Hirata K, Debnath A, McKerrow JH, Reed SL, Abagyan R, Poole LB, Podust LM, 2016. X-ray structures of thioredoxin and thioredoxin reductase from *Entamoeba histolytica* and prevailing hypothesis of the mechanism of Auranofin action. *Journal of Structural Biology* **194**: 180–190.

Patel R, Orlandi RR, 2015. Fungal septal abscess complicating maxillary sinus fungus balls in an immunocompetent host. *Allergy and Rhinology* **6**: 184–187.

Pateau V, Razafimandimby B, Vandeputte P, Thornton CR, Guillemette T, Bouchara JP, Giraud S, 2017. Gene disruption in *Scedosporium aurantiacum*: proof of concept with the disruption of *SODC* gene encoding a cytosolic Cu,Zn-superoxide dismutase. *Mycopathologia*.

Patterson MJ, McKenzie CG, Smith DA, da Silva Dantas A, Sherston S, Veal EA, Morgan BA, MacCallum DM, Erwig L-P, Quinn J, 2013. Ybp1 and Gpx3 signaling in *Candida albicans* govern hydrogen peroxide-induced oxidation of the Cap1 transcription factor and macrophage escape. *Antioxidants and Redox Signaling* **19**: 2244–2260.

Paugam A, Baixench M-T, Demazes-Dufeu N, Burgel P-R, Sauter E, Kanaan R, Dusser D, Dupouy-Camet J, Hubert D, 2010. Characteristics and consequences of airway colonization by filamentous fungi in 201 adult patients with cystic fibrosis in France. *Medical Mycology* **48 Suppl 1**: S32-36.

Paul S, Doering TL, Moye-Rowley WS, 2015. *Cryptococcus neoformans* Yap1 is required for normal fluconazole and oxidative stress resistance. *Fungal Genetics and Biology* **74**: 1–9.

Pederiva MA, Wissmann G, Friaza V, Morilla R, de La Horra C, Montes-Cano MA, Goldani LZ, Calderón EJ, Prolla JC, 2012. High prevalence of *Pneumocystis jirovecii* colonization in Brazilian cystic fibrosis patients. *Medical Mycology* **50**: 556–560.

Pedrajas JR, Kosmidou E, Miranda-Vizuete A, Gustafsson JA, Wright AP, Spyrou G, 1999. Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **274**: 6366–6373.

Pellon A, Ramirez-Garcia A, Antoran A, Fernandez-Molina JV, Abad-Diaz-de-Cerio A, Montañez D, Sevilla MJ, Rementeria A, Hernando FL, 2014. *Scedosporium prolificans* immunomes against human salivary immunoglobulin A. *Fungal Biology* **118**: 94–105.

Pereira MM, Silva BA, Pinto MR, Barreto-Bergter E, dos Santos ALS, 2009. Proteins and peptidases from conidia and mycelia of *Scedosporium apiospermum* strain HLPB. *Mycopathologia* **167**: 25–30.

Pérez-Bercoff Å, Papanicolaou A, Ramsperger M, Kaur J, Patel HR, Harun A, Duan SY, Elbourne L, Bouchara JP, Paulsen IT, Nevalainen H, Meyer W, Huttley GA, 2015. Draft genome of australian environmental strain WM 09.24 of the opportunistic human pathogen *Scedosporium aurantiacum*. *Genome Announcements* **3(1)**. pii: e01526-14.

Pham T, Giraud S, Schuliar G, Rougeron A, Bouchara JP, 2015. Scedo-Select III: a new semi-selective culture medium for detection of the *Scedosporium apiospermum* species complex. *Medical Mycology* **53:** 512-519

Phillips AJ, Sudbery I, Ramsdale M, 2003. Apoptosis induced by environmental stresses and amphotericin B in *Candida albicans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**: 14327–14332.

Pihet M, Carrère J, Cimon B, Chabasse D, Delhaes L, Symoens F, Bouchara JP, 2008. Occurrence and relevance of filamentous fungi in respiratory secretions of patients with cystic fibrosis – a review. *Medical Mycology* **47**: 387–397.

Pinto MR, Mulloy B, Haido RMT, Travassos LR, Bergter EB, 2001. A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen. *Microbiology* **147**: 1499–1506.

Pinto MR, Rodrigues ML, Travassos LR, Haido RMT, Wait R, Barreto-Bergter E, 2002. Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. *Glycobiology* **12**: 251–260.

Pinto MR, De Sá ACM, Limongi CL, Rozental S, Santos ALS, Barreto-Bergter E, 2004. Involvement of peptidorhamnomannan in the interaction of *Pseudallescheria boydii* and HEp2 cells. *Microbes and Infection* **6**: 1259–1267.

Plancarte A, Nava G, 2015. Purification and kinetic analysis of cytosolic and mitochondrial thioredoxin glutathione reductase extracted from *Taenia solium* cysticerci. *Experimental Parasitology* **149**: 65–73.

Plancarte A, Nava G, Munguía JA, 2017. A new thioredoxin reductase with additional glutathione reductase activity in *Haemonchus contortus*. *Experimental Parasitology* **177**: 82–92.

Ponchel C, Cassaing S, Linas M-D, Arné J-L, Fournié P, 2007. Fungal keratitis caused by *Scedosporium apiospermum*. *Journal Francais d'Ophtalmologie* **30**: 933–937.

Poole RK, Hughes MN, 2000. New functions for the ancient globin family: bacterial responses to nitric oxide and nitrosative stress. *Molecular Microbiology* **36**: 775–783.

Prigitano A, Esposto MC, Biffi A, De Lorenzis G, Favuzzi V, Koncan R, Lo Cascio G, Barao Ocampo M, Colombo C, Pizzamiglio G, Romanò L, Tortorano AM, 2017. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis in Italy. *Journal of Cystic Fibrosis* **16**: 64–69.

Prodouz KN, Garrett RH, 1981. *Neurospora crassa* NAD(P)H-nitrite reductase. Studies on its composition and structure. *The Journal of Biological Chemistry* **256**: 9711–9717.

Qiao J, Kontoyiannis DP, Calderone R, Li D, Ma Y, Wan Z, Li R, Liu W, 2008. Afyap1, encoding a bZip transcriptional factor of *Aspergillus fumigatus*, contributes to oxidative stress response but is not essential to the virulence of this pathogen in mice immunosuppressed by cyclophosphamide and triamcinolone. *Medical Mycology* **46**: 773–782.

Qiao J, Liu W, Li R, 2010. Truncated Afyap1 attenuates antifungal susceptibility of *Aspergillus fumigatus* to voriconazole and confers adaptation of the fungus to oxidative stress. *Mycopathologia* **170**: 155–160.

Quattrucci S, Rolla M, Cimino G, Bertasi S, Cingolani S, Scalercio F, Venuta F, Midulla F, 2005. Lung transplantation for cystic fibrosis: 6-year follow-up. *Journal of Cystic Fibrosis* **4**: 107–114.

Queiroz-Telles F, McGinnis MR, Salkin I, Graybill JR, 2003. Subcutaneous mycoses. *Infectious Disease Clinics of North America* **17**: 59–85, viii.

Quinton PM, Bijman J, 1983. Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. *The New England Journal of Medicine* **308**: 1185–1189.

Rabodonirina M, Paulus S, Thevenet F, Loire R, Gueho E, Bastien O, Mornex JF, Celard M, Piens MA, 1994. Disseminated *Scedosporium prolificans* (*S. inflatum*) infection after single-lung transplantation. *Clinical Infectious Diseases* **19**: 138–142.

Raggam RB, Salzer HJF, Marth E, Heiling B, Paulitsch AH, Buzina W, 2011. Molecular detection and characterisation of fungal heat shock protein 60. *Mycoses* **54**: e394-399.

Rahman FU, Irfan M, Fasih N, Jabeen K, Sharif H, 2016. Pulmonary scedosporiosis mimicking aspergilloma in an immunocompetent host: a case report and review of the literature. *Infection* **44**: 127–132.

Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, Summerbell RC, 2008. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. *Antonie Van Leeuwenhoek* **93**: 315–322.

Ramirez-Garcia A, Pellon A, Buldain I, Antoran A, Arbizu-Delgado A, Guruceaga X, Rementeria A, Hernando FL, 2017a. Proteomics as a tool to identify new targets against *Aspergillus* and *Scedosporium* in the context of cystic fibrosis. *Mycopathologia*.

Ramirez-Garcia A, Pellon A, Rementeria A, Buldain I, Barreto-Berguer E, Rollin-Pinheiro R, Vieira de Meirelles J, XIsto MI, Ranque S, Havlicek V, Vandeputte P, Le Govic Y, Bouchara JP, Giraud S, Chen S, Rainer J, Alastruey-Izquierdo A, Martin-Gomez MT, López-Soria LM, Peman J, Schwarz C, Bernhard A, Tintelnot K, Capilla J, Martin Vicente A, Cano-Lira J, Nagl M, Lackner M, Irinyi L, Meyer W, de Hoog S, Hernando FL, 2017b. *Scedosporium* complex and *Lomentospora prolificans*: an updated overview of underrated opportunist. *Medical Mycology*.

Ramos Martínez A, Orden Martínez B, Polo Laborda J, García Magallón B, Fernández Castro M, Ortega Sánchez C, Gil Navarro M, 2012. [Slow onset septic arthritis by *Scedosporium apiospermum* after periarticular infiltration]. *Revista Iberoamericana De Micologia* **29**: 241–244.

van Rantwijk F, Sheldon RA, 2000. Selective oxygen transfer catalysed by heme peroxidases: synthetic and mechanistic aspects. *Current Opinion in Biotechnology* **11**: 554–564.

Rathi HS, Venugopal A, Rengappa R, Ravindran M, 2016. *Scedosporium* keratitis: An experience from a tertiary eye hospital in South India. *Cornea* **35**: 1575–1577.

Ratti BA, Godoy JSR, de Souza Bonfim Mendonça P, Bidóia DL, Nakamura TU, Nakamura CV, Lopes Consolaro ME, Estivalet Svidzinski TI, de Oliveira Silva S, 2015. Microbicidal activity of neutrophils is inhibited by isolates from recurrent vaginal candidiasis (RVVC) caused by *Candida albicans* through fungal thioredoxin reductase. *Cellular Immunology* **293**: 22–29.

Rendón JL, del Arenal IP, Guevara-Flores A, Uribe A, Plancarte A, Mendoza-Hernández G, 2004. Purification, characterization and kinetic properties of the multifunctional thioredoxin-glutathione reductase from *Taenia crassiceps* metacestode (cysticerci). *Molecular and Biochemical Parasitology* **133**: 61–69.

Respaldiza N, Montes-Cano MA, Dapena FJ, de la Horra C, Mateos I, Medrano FJ, Calderon E, Varela JM, 2005. Prevalence of colonisation and genotypic characterisation of *Pneumocystis jirovecii* among cystic fibrosis patients in Spain. *Clinical Microbiology and Infection* **11**: 1012–1015.

Reverberi M, Gazzetti K, Punelli F, Scarpari M, Zjalic S, Ricelli A, Fabbri AA, Fanelli C, 2012. Aoyap1 regulates OTA synthesis by controlling cell redox balance in *Aspergillus ochraceus*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **95**: 1293–1304.

Reverberi M, Zjalic S, Punelli F, Ricelli A, Fabbri AA, Fanelli C, 2007. Apyap1 affects aflatoxin biosynthesis during *Aspergillus parasiticus* growth in maize seeds. *Food Additives and Contaminants* **24**: 1070–1075.

Reverberi M, Zjalic S, Ricelli A, Punelli F, Camera E, Fabbri C, Picardo M, Fanelli C, Fabbri AA, 2008. Modulation of antioxidant defense in *Aspergillus parasiticus* is involved in aflatoxin biosynthesis: a role for the ApyapA gene. *Eukaryotic Cell* **7**: 988–1000.

Reznikov LR, 2017. Cystic fibrosis and the nervous system. *Chest* **151**: 1147–1155.

Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* **245**: 1066–1073.

Rippon JW, Carmichael JW, 1976. *Petriellidiosis* (allescheriosis): four unusual cases and review of literature. *Mycopathologia* **58**: 117–124.

Robert R, Thoreau V, Norez C, Cantereau A, Kitzis A, Mettey Y, Rogier C, Becq F, 2004. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator channel by beta-adrenergic agonists and vasoactive intestinal peptide in rat smooth muscle cells and its role in vasorelaxation. *The Journal of Biological Chemistry* **279**: 21160–21168.

Robertson JG, 2005. Mechanistic basis of enzyme-targeted drugs. *Biochemistry* **44**: 5561–5571.

Roder C, Thomson MJ, 2015. Auranofin: repurposing an old drug for a golden new age. *Drugs in R&D* **15**: 13–20.

Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Guarro J, Kantarcioglu AS, Horre R, de Hoog GS, Cuenca-Estrella M, 2009. Epidemiology and outcome of *Scedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases. *Medical Mycology* **47**: 359–370.

Rolfe NE, Haddad TJ, Wills TS, 2013. Management of *Scedosporium apiospermum* in a pre- and post-lung transplant patient with cystic fibrosis. *Medical Mycology Case Reports* **2**: 37–39.

Rolke Y, Liu S, Quidde T, Williamson B, Schouten A, Weltring K-M, Siewers V, Tenberge KB, Tudzynski B, Tudzynski P, 2004. Functional analysis of H_2O_2-generating systems in *Botrytis cinerea*: the major Cu-Zn-superoxide dismutase (BCSOD1) contributes to virulence on French bean, whereas a glucose oxidase (BCGOD1) is dispensable. *Molecular Plant Pathology* **5**: 17–27.

Rollin-Pinheiro R, Liporagi-Lopes LC, De Meirelles JV, De Souza LM, Barreto-Bergter E, 2014. Characterization of *Scedosporium apiospermum* glucosylceramides and their involvement in fungal development and macrophage functions. *PLoS One* **9(5)**: e98149.

Román E, Prieto D, Martin R, Correia I, Mesa Arango AC, Alonso-Monge R, Zaragoza O, Pla J, 2016. Role of catalase overproduction in drug resistance and virulence in *Candida albicans*. *Future Microbiology* **11**: 1279–1297.

Romey M-C, 2006. Caractérisation fonctionnelle de mutants CFTR naturels : intérêt pour la mucoviscidose. *Annales de Biologie Clinique* **64**: 429–437.

Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, Rozmahel R, Cole JL, Kennedy D, Hidaka N, 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. *Science* **245**: 1059–1065.

Rondeau S, Couderc L, Dominique S, Pramil S, Leguillon C, Masseline B, Favennec L, Marguet C, 2012. High frequency of voriconazole-related phototoxicity in cystic fibrosis patients. *The European Respiratory Journal* **39**: 782–784.

Ronen M, Shalaby S, Horwitz BA, 2013. Role of the transcription factor ChAP1 in cytoplasmic redox homeostasis: imaging with a genetically encoded sensor in the maize pathogen *Cochliobolus heterostrophus*. *Molecular Plant Pathology* **14**: 786–790.

Rougeron A, Giraud S, Alastruey-Izquierdo A, Cano J, Rainer J, Mouhajir M, Le Gal S, Nevez G, Meyer W, Bouchara JP 2017. Ecology of *Scedosporium* species: present knowledge and future research. Mycopathologia.

Rougeron A, Giraud S, Razafimandimby B, Meis JF, Bouchara JP, Klaassen CHW, 2014. Different colonization patterns of *Aspergillus terreus* in patients with cystic fibrosis. *Clinical Microbiology and Infection* **20**: 327–333.

Rougeron A, Schuliar G, Leto J, Sitterlé E, Landry D, Bougnoux M-E, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S, 2015. Human-impacted areas of France are environmental reservoirs of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* species complex. *Environmental Microbiology* **17**: 1039–1048.

Sahi H, Avery RK, Minai OA, Hall G, Mehta AC, Raina P, Budev M, 2007. *Scedosporium apiospermum* (*Pseudallescheria boydii*) infection in lung transplant recipients. *The Journal of Heart and Lung Transplantation* **26**: 350–356.

Sampaio FMS, Wanke B, Freitas DFS, Coelho JMC de O, Galhardo MCG, Lyra MR, Lourenço MC da S, Paes R de A, do Valle ACF, 2017. Review of 21 cases of mycetoma from 1991 to 2014 in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **11**: e0005301.

Sangalli-Leite F, Scorzoni L, Mesa-Arango AC, Casas C, Herrero E, Gianinni MJSM, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M, Zaragoza O, 2011. Amphotericin B mediates killing in *Cryptococcus neoformans* through the induction of a strong oxidative burst. *Microbes and Infection* **13**: 457–467.

Sannella AR, Casini A, Gabbiani C, Messori L, Bilia AR, Vincieri FF, Majori G, Severini C, 2008. New uses for old drugs. Auranofin, a clinically established antiarthritic metallodrug, exhibits potent antimalarial effects in vitro: Mechanistic and pharmacological implications. *FEBS Letters* **582**: 844–847.

Santos ALS, Bittencourt VCB, Pinto MR, Silva BA, Barreto-Bergter E, 2009. Biochemical characterization of potential virulence markers in the human fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. *Medical Mycology* **47**: 375–386.

Sarfati J, Monod M, Recco P, Sulahian A, Pinel C, Candolfi E, Fontaine T, Debeaupuis JP, Tabouret M, Latgé JP, 2006. Recombinant antigens as diagnostic markers for aspergillosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **55**: 279–291.

Sarva ST, Manjunath SK, Baldwin HS, Robins DB, Freire AX, 2010. Lung scedosporiosis in human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome. *The American Journal of the Medical Sciences* **339**: 300–303.

Schemuth H, Dittmer S, Lackner M, Sedlacek L, Hamprecht A, Steinmann E, Buer J, Rath P-M, Steinmann J, 2013. *In vitro* activity of colistin as single agent and in combination with antifungals against filamentous fungi occurring in patients with cystic fibrosis. *Mycoses* **56**: 297–303.

Schønheyder H, Jensen T, Høiby N, Koch C, 1988. Clinical and serological survey of pulmonary aspergillosis in patients with cystic fibrosis. *International Archives of Allergy and Applied Immunology* **85**: 472–477.

Schwarz C, Brandt C, Antweiler E, Krannich A, Staab D, Schmitt-Grohé S, Fischer R, Hartl D, Thronicke A, Tintelnot K, 2017a. Prospective multicenter German study on pulmonary colonization with *Scedosporium /Lomentospora* species in cystic fibrosis: Epidemiology and new association factors. *PloS One* **12**: e0171485.

Schwarz C, Hartl D, Eickmeier O, Hector A, Benden C, Durieu I, Sole A, Gartner S, Barry PJ. Progress in definition, prevention and treatment of fungal infections in cystic fibrosis. Mycopathologia 2017b.

Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, Albert F, Peter S, Würstl B, Wagner S, Klotz M, Becker A, Haase G, Laniado G, Kahl B, Suerbaum S, Seibold M, Tintelnot K, 2015. Prevalence of *Scedosporium species* and *Lomentospora prolificans* in patients with cystic fibrosis in a multicenter trial by use of a selective medium. *Journal of Cystic Fibrosis* **14**: 237–41.

Severo LC, Oliveira F de M, Irion K, 2004. Respiratory tract intracavitary colonization due to *Scedosporium apiospermum*: report of four cases. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* **46**: 43–46.

Shah AV, McColley SA, Weil D, Zheng X, 2014. *Trichosporon mycotoxinivorans* infection in patients with cystic fibrosis. *Journal of Clinical Microbiology* **52**: 2242–2244.

Sharlow ER, Leimgruber S, Murray S, Lira A, Sciotti RJ, Hickman M, Hudson T, Leed S, Caridha D, Barrios AM, Close D, Grögl M, Lazo JS, 2014. Auranofin is an apoptosis-simulating agent with *in vitro* and *in vivo* anti-leishmanial activity. *ACS Chemical Biology* **9**: 663–672.

Sharlow ER, Lyda TA, Dodson HC, Mustata G, Morris MT, Leimgruber SS, Lee K-H, Kashiwada Y, Close D, Lazo JS, Morris JC, 2010. A target-based high throughput screen yields *Trypanosoma brucei* hexokinase small molecule inhibitors with antiparasitic activity. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **4**: e659.

Sharma A, Singh D, 2015. *Scedosporium apiospermum* causing brain abscess in a renal allograft recipient. *Saudi Journal of Kidney Diseases and Transplantation* **26**: 1253–1256.

Shelton MD, Chock PB, Mieyal JJ, 2005. Glutaredoxin: role in reversible protein s-glutathionylation and regulation of redox signal transduction and protein translocation. *Antioxidants and Redox Signaling* **7**: 348–366.

Sherrard LJ, Tunney MM, Elborn JS, 2014. Antimicrobial resistance in the respiratory microbiota of people with cystic fibrosis. *Lancet* **384**: 703–713.

Shi L, Li F, Huang M, Lu J, Kong X, Wang S, Shao H, 2012a. Immunoproteomics based identification of thioredoxin reductase GliT and novel *Aspergillus fumigatus* antigens for serologic diagnosis of invasive aspergillosis. *BMC microbiology* **12**: 11.

Shi L, Li F, Lu J, Kong X, Wang S, Huang M, Shao H, Shao S, 2012b. Antibody specific to thioredoxin reductase as a new biomarker for serodiagnosis of invasive aspergillosis in non-neutropenic patients. *Clinica Chimica Acta* **413**: 938–943.

Sidot C, Simon P, Bouchara JP, Chabasse D, Urban T, Giniès JL, 2007. 116 *Scedosporium apiospermum*. Environmental study in the homes of patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **6**: S29.

Signore SC, Dohm CP, Schütze G, Bähr M, Kermer P, 2017. *Scedosporium apiospermum* brain abscesses in a patient after near-drowning - a case report with 10-year follow-up and a review of the literature. *Medical Mycology Case Reports* **17**: 17–19.

da Silva BA, dos Santos ALS, Barreto-Bergter E, Pinto MR, 2006. Extracellular peptidase in the fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. *Current Microbiology* **53**: 18–22.

da Silva MTA, Silva-Jardim I, Portapilla GB, de Lima GMA, Costa FC, Anibal F de F, Thiemann OH, 2016. *In vivo* and *in vitro* auranofin activity against *Trypanosoma cruzi*: Possible new uses for an old drug. *Experimental Parasitology* **166**: 189–193.

da Silva BA, Sodré CL, Souza-Gonçalves AL, Aor AC, Kneipp LF, Fonseca BB, Rozental S, Romanos MTV, Sola-Penna M, Perales J, Kalume DE, dos Santos ALS, 2012. Proteomic analysis of the secretions of *Pseudallescheria boydii*, a human fungal pathogen with unknown genome. *Journal of Proteome Research* **11**: 172–188.

Silva BA, Pinto MR, Soares RMA, Barreto-Bergter E, Santos ALS, 2006. *Pseudallescheria boydii* releases metallopeptidases capable of cleaving several proteinaceous compounds. *Research in Microbiology* **157**: 425–432.

Silva BA, Souza-Gonçalves AL, Pinto MR, Barreto-Bergter E, Santos ALS, 2011. Metallopeptidase inhibitors arrest vital biological processes in the fungal pathogen *Scedosporium apiospermum*. *Mycoses* **54**: 105–112.

Sing A, Geiger AM, Hogardt M, Heesemann J, 2001. *Pneumocystis carinii* carriage among cystic fibrosis patients, as detected by nested PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 2717–2718.

Singh B, Oellerich M, Kumar R, Kumar M, Bhadoria DP, Reichard U, Gupta VK, Sharma GL, Asif AR, 2010. Immuno-reactive molecules identified from the secreted proteome of *Aspergillus fumigatus*. *Journal of Proteome Research* **9**: 5517–5529.

Singh K, Boileau MJ, Streeter RN, Welsh RD, Meier WA, Ritchey JW, 2007. Granulomatous and eosinophilic rhinitis in a cow caused by *Pseudallescheria boydii* species complex (Anamorph *Scedosporium apiospermum*). *Veterinary Pathology* **44**: 917–920.

Sitterlé E, Giraud S, Leto J, Bouchara JP, Rougeron A, Morio F, Dauphin B, Angebault C, Quesne G, Beretti JL, Hassouni N, Nassif X, Bougnoux ME, 2014 Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/Scedosporium* species. *Clinical Microbiology Infection* **20:** 929–935

Siverio JM, 2002. Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews* **26**: 277–284.

Skamnioti P, Henderson C, Zhang Z, Robinson Z, Gurr SJ, 2007. A novel role for catalase B in the maintenance of fungal cell-wall integrity during host invasion in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea. Molecular Plant-Microbe interactions Journal* **20:** 568-580

Sohma Y, Ying-Chun Y, Tzyh-Chang H, 2016. Curcumin and genistein: the combined effects on disease-associated CFTR mutants and their clinical implications. *Current Pharmaceutical Design* **19**: 3521-3528

Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G, 1986. Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *The Journal of Infectious Diseases* **154**: 76–83.

Sokol-Anderson M, Sligh JE, Elberg S, Brajtburg J, Kobayashi GS, Medoff G, 1988. Role of cell defense against oxidative damage in the resistance of *Candida albicans* to the killing effect of amphotericin B. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **32**: 702–705.

Song L, Li J, Xie S, Qian C, Wang J, Zhang W, Yin X, Hua Z, Yu C, 2012. Thioredoxin glutathione reductase as a novel drug target: evidence from *Schistosoma japonicum*. *PloS One* **7**: e31456.

Soteropoulos P, Vaz T, Santangelo R, Paderu P, Huang DY, Tamás MJ, Perlin DS, 2000. Molecular characterization of the plasma membrane H(+)-ATPase, an antifungal target in *Cryptococcus neoformans*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**: 2349–2355.

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

Srinivasa K, Kim N-R, Kim J, Kim M, Bae JY, Jeong W, Kim W, Choi W, 2012. Characterization of a putative thioredoxin peroxidase Prx1 of *Candida albicans*. *Molecules and Cells* **33**: 301–307.

Staerck C, Gastebois A, Vandeputte P, Calenda A, Larcher G, Gillmann L, Papon N, Bouchara JP, Fleury MJJ, 2017a Microbial antioxidant defense enzymes. *Microbial Pathogenesis* **110**: 56–65.

Staerck C, Vandeputte P, Gastebois A, Calenda A, Giraud S, Papon N, Bouchara JP, Fleury MJJ, 2017b. Enzymatic mechanisms involved in evasion of fungi to the oxidative stress: Focus on *Scedosporium apiospermum*. *Mycopathologia*.

Starosta V, Rietschel E, Paul K, Baumann U, Griese M, 2006. Oxidative changes of bronchoalveolar proteins in cystic fibrosis. *Chest* **129**: 431–437.

Stein C, Makarewicz O, Bohnert JA, Pfeifer Y, Kesselmeier M, Hagel S, Pletz MW, 2015. Three dimensional checkerboard synergy analysis of colistin, meropenem, tigecycline against multidrug-resistant clinical *Klebsiella pneumonia* isolates. *PLoS One* **10**: e0126479.

Stoneham ACS, Stoneham SE, Wyllie SA, Pandya AN, 2017. Surgical resection of a rare cutaneous manifestation of *Scedosporium apiospermum* in a patient who underwent renal transplant. *BMJ case reports* **2017**. pii: bcr2016217923.

Sugui JA, Kim HS, Zarember KA, Chang YC, Gallin JI, Nierman WC, Kwon-Chung KJ, 2008. Genes differentially expressed in conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon exposure to human neutrophils. *PloS One* **3**: e2655.

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

Sun Y, Wang Y, Tian C, 2016. b*ZIP* transcription factor CgAP1 is essential for oxidative stress tolerance and full virulence of the poplar anthracnose fungus C*olletotrichum gloeosporioides*. *Fungal genetics and biology* **95**: 58–66.

Symoens F, Haase G, Pihet M, Carrère J, Beguin H, Degand N, Mély L, Bouchara JP, 2010. Unusual *Aspergillus* species in patients with cystic fibrosis. *Medical Mycology* **48 Suppl 1**: S10-16.

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

Tainer JA, Getzoff ED, Beem KM, Richardson JS, Richardson DC, 1982. Determination and analysis of the 2 Å structure of copper, zinc superoxide dismutase. *Journal of Molecular Biology* **160**: 181–217.

Taj-Aldeen SJ, Rammaert B, Gamaletsou M, Sipsas NV, Zeller V, Roilides E, Kontoyiannis DP, Miller AO, Petraitis V, Walsh TJ, Lortholary O, 2015. Osteoarticular infections caused by non-*Aspergillus* filamentous fungi in adult and pediatric patients. *Medicine* **94**: e2078.

Takahashi M, Yamashita K, Shiozawa A, Ichiishi A, Fukumori F, Fujimura M, 2010. An AP-1-like transcription factor, NAP-1, regulates expression of the glutathione S-transferase and NADH:flavin oxidoreductase genes in *Neurospora crassa. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* **74**: 746–752.

Tamayo D, Muñoz JF, Lopez Á, Urán M, Herrera J, Borges CL, Restrepo Á, Soares CM, Taborda CP, Almeida AJ, McEwen JG, Hernández O, 2016. Identification and analysis of the role of superoxide dismutases isoforms in the pathogenesis of *Paracoccidioides spp. PLoS neglected tropical diseases* **10**: e0004481.

Tang W, Ru Y, Hong L, Zhu Q, Zuo R, Guo X, Wang J, Zhang H, Zheng X, Wang P, Zhang Z, 2015. System-wide characterization of b*ZIP* transcription factor proteins involved in infection-related morphogenesis of *Magnaporthe oryzae*. *Environmental Microbiology* **17**: 1377–1396.

Tejman-Yarden N, Miyamoto Y, Leitsch D, Santini J, Debnath A, Gut J, McKerrow JH, Reed SL, Eckmann L, 2013. A reprofiled drug, auranofin, is effective against metronidazole-resistant *Giardia lamblia*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **57**: 2029–2035.

Temme N, Tudzynski P, 2009. Does *Botrytis cinerea* ignore H_2O_2-induced oxidative stress during infection? Characterization of botrytis activator protein 1. *Molecular plant-microbe interactions* **22**: 987–998.

Thangamani S, Eldesouky HE, Mohammad H, Pascuzzi PE, Avramova L, Hazbun TR, Seleem MN, 2017a. Ebselen exerts antifungal activity by regulating glutathione (GSH) and reactive oxygen species (ROS) production in fungal cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **1861**: 3002–3010.

Thangamani S, Maland M, Mohammad H, Pascuzzi PE, Avramova L, Koehler CM, Hazbun TR, Seleem MN, 2017b. Repurposing approach identifies auranofin with broad spectrum antifungal activity that targets Mia40-Erv1 Pathway. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* **7**: 4.

Thangamani S, Mohammad H, Abushahba MFN, Sobreira TJP, Hedrick VE, Paul LN, Seleem MN, 2016a. Antibacterial activity and mechanism of action of auranofin against multi-drug resistant bacterial pathogens. *Scientific Reports* **6**: 22571.

Thangamani S, Mohammad H, Abushahba MFN, Sobreira TJP, Seleem MN, 2016b. Repurposing auranofin for the treatment of cutaneous staphylococcal infections. *International Journal of Antimicrobial Agents* **47**: 195–201.

Thangamani S, Younis W, Seleem MN, 2015a. Repurposing clinical molecule ebselen to combat drug resistant pathogens. *PloS One* **10**: e0133877.

Thangamani S, Younis W, Seleem MN, 2015b. Repurposing ebselen for treatment of multidrug-resistant staphylococcal infections. *Scientific Reports* **5**: 11596.

Thirach S, Cooper CR, Vanittanakom P, Vanittanakom N, 2007. The copper, zinc superoxide dismutase gene of *Penicillium marneffei*: cloning, characterization, and differential expression during phase transition and macrophage infection. *Medical Mycology* **45**: 409–417.

Thomson S, Alibhai K, Winkelaar G, Lien D, Halloran K, Kapasi A, Weinkauf J, 2015. Case report of vertebral osteomyelitis and mycotic abdominal aortic aneurysm caused by *Scedosporium apiospermum* in a lung transplant patient with cystic fibrosis. *Transplantation Proceedings* **47**: 204–209.

Tian C, Li J, Glass NL, 2011. Exploring the b*ZIP* transcription factor regulatory network in *Neurospora crassa*. *Microbiology* **157**: 747–759.

Tildy B.E, Rogers D.F, 2015. Therapeutic options for hydrating airway mucus in cystic fibrosis. *Pharmacology* **95**: 117-132

Tilley LD, Krishnamurthy S, Westwood NJ, Ward GE, 2014. Identification of TgCBAP, a novel cytoskeletal protein that localizes to three distinct subcompartments of the *Toxoplasma gondii* pellicle. *PloS One* **9**: e98492.

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

Tintelnot K, Wagner N, Seibold M, de Hoog GS, Horré R, 2008. Re-identification of clinical isolates of the *Pseudallescheria boydii*-complex involved in near-drowning. *Mycoses* **51 Suppl 3**: 11–16.

Toone WM, Kuge S, Samuels M, Morgan BA, Toda T, Jones N, 1998. Regulation of the fission yeast transcription factor Pap1 by oxidative stress: requirement for the nuclear export factor Crm1 (Exportin) and the stress-activated MAP kinase Sty1/Spc1. *Genes and Development* **12**: 1453–1463.

Toone WM, Morgan BA, Jones N, 2001. Redox control of AP-1-like factors in yeast and beyond. *Oncogene* **20**: 2336–2346.

Tortorano AM, Dho G, Prigitano A, Breda G, Grancini A, Emmi V, Cavanna C, Marino G, Morero S, Ossi C, Delvecchio G, Passera M, Cusumano V, David A, Bonaccorso G, Corona A, Favaro M, Vismara C, Garau MG, Falchi S, Tejada MR, ECMM-FIMUA Study Group, 2012. Invasive fungal infections in the intensive care unit: a multicentre, prospective, observational study in Italy (2006-2008). *Mycoses* **55**: 73–79.

Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, van Diepeningen A, Caira M, Munoz P, Johnson E, Meletiadis J, Pana Z-D, Lackner M, Verweij P, Freiberger T, Cornely OA, Arikan-Akdagli S, Dannaoui E, Groll AH, Lagrou K, Chakrabarti A, Lanternier F, Pagano L, Skiada A, Akova M, Arendrup MC, Boekhout T, Chowdhary A, Cuenca-Estrella M, Guinea J, Guarro J, de Hoog S, Hope W, Kathuria S, Lortholary O, Meis JF, Ullmann AJ, Petrikkos G, Lass-Flörl C, 2014. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. *Clinical Microbiology and Infection* **20**: 27–46.

Tóth EJ, Nagy GR, Homa M, Ábrók M, Kiss IÉ, Nagy G, Bata-Csörgő Z, Kemény L, Urbán E, Vágvölgyi C, Papp T, 2017. Recurrent *Scedosporium apiospermum* mycetoma successfully treated by surgical excision and terbinafine treatment: a case report and review of the literature. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* **16**: 31.

Tran Van Ky P, Biguet J, Vaucelle T, 1968. Study on an antigenic fraction of *Aspergillus fumigatus* supporting a catalase activity. Consequence on the immunologic diagnosis of aspergillosis. Revue d'Immunol ogie et de Thérapie Antimicrobienne **32:** 37–52.

Troke P, Aguirrebengoa K, Arteaga C, Ellis D, Heath CH, Lutsar I, Rovira M, Nguyen Q, Slavin M, Chen SCA, 2008. Treatment of scedosporiosis with voriconazole: Clinical experience with 107 patients. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **52**: 1743–1750.

Turgeon BG, Condon B, Liu J, Zhang N, 2010. Protoplast transformation of filamentous fungi. *Methods in Biology* **638**: 3–19.

Uenotsuchi T, Moroi Y, Urabe K, Tsuji G, Koga T, Matsuda T, Furue M, 2005. Cutaneous *Scedosporium apiospermum* infection in an immunocompromised patient and a review of the literature. *Acta Dermato-Venereologica* **85**: 156–159.

Ushimaru T, Terada H, Tsuboi K, Kogou Y, Sakaguchi A, Tsuji G, Kubo Y, 2010. Development of an efficient gene targeting system in *Colletotrichum higginsianum* using a non-homologous end-joining mutant and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. *Molecular genetics and genomics* **284**: 357–371.

Uziel O, Borovok I, Schreiber R, Cohen G, Aharonowitz Y, 2004. Transcriptional regulation of the *Staphylococcus aureus* thioredoxin and thioredoxin reductase genes in response to oxygen and disulfide stress. *Journal of Bacteriology* **186**: 326–334.

Vagefi MR, Kim ET, Alvarado RG, Duncan JL, Howes EL, Crawford JB, 2005. Bilateral endogenous *Scedosporium prolificans* endophthalmitis after lung transplantation. *American Journal of Ophthalmology* **139**: 370–373.

de Valk HA, Klaassen CHW, Yntema J-B, Hebestreit A, Seidler M, Haase G, Müller F-M, Meis JFGM, 2009. Molecular typing and colonization patterns of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. *Journal of Cystic Fibrosis* **8**: 110–114.

Van Grunderbeeck N, Conseil V, Leroy S, Wallaert B, Delhaes L, 2010. The fungal risk in cystic fibrosis: a pilot study. *Annales de Biologie Clinique* **68**: 157–162.

Vandeputte P, Ghamrawi S, Rechenmann M, Iltis A, Giraud S, Fleury M, Thornton C, Delhaès L, Meyer W, Papon N, Bouchara JP, 2014. Draft genome sequence of the pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. *Genome Announcements* **2(5)**. pii: e0098!-14.

Vanhee LME, Symoens F, Bouchara JP, Nelis HJ, Coenye T, 2008a. High-resolution genotyping of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from chronically colonised patients with cystic fibrosis. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **27**: 1005–1007.

Vanhee LME, Symoens F, Nelis HJ, Coenye T, 2008b. Microsatellite typing of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from deep organ samples of patients with invasive aspergillosis. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* **62**: 96–98.

Vankeerberghen A, Cuppens H, Cassiman J-J, 2002. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator: an intriguing protein with pleiotropic functions. *Journal of Cystic Fibrosis* **1**: 13–29.

Vanzzini-Zago V, Corredor-Casas S, Rodríguez-Reyes A, Hernández-Hernández F, Manzano-Gayosso P, Martínez RL, Orozco ARA, 2016. Endophthalmitis of probable endogenous origin caused by *Scedosporium boydii*: A case report. *Revista Iberoamericana de Micologia* **33**: 122–125.

Vázquez-Tsuji O, Campos Rivera T, Rondán Zárate A, Mirabal García M, 2006. Endobronchitis by *Scedosporium apiospermum* in a child with cystic fibrosis. *Revista Iberoamericana de Micología* **23**: 245–248.

Venturini TP, Chassot F, Loreto ÉS, Keller JT, Azevedo MI, Zeni G, Santurio JM, Alves SH, 2016. Antifungal activities of diphenyl diselenide and ebselen alone and in combination with antifungal agents against *Fusarium* spp. *Medical Mycology* **54**: 550–555.

Viefhues A, Heller J, Temme N, Tudzynski P, 2014. Redox systems in *Botrytis cinerea*: impact on development and virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **27**: 858–874.

Vincent BM, Lancaster AK, Scherz-Shouval R, Whitesell L, Lindquist S, 2013. Fitness trade-offs restrict the evolution of resistance to amphotericin B. *PLoS biology* **11**: e1001692.

Voisin G, Bouvet GF, Legendre P, Dagenais A, Massé C, Berthiaume Y, 2014. Oxidative stress modulates the expression of genes involved in cell survival in ΔF508 cystic fibrosis airway epithelial cells. *Physiological Genomics* **46**: 634–646.

de Vrankrijker AMM, van der Ent CK, van Berkhout FT, Stellato RK, Willems RJL, Bonten MJM, Wolfs TFW, 2011. *Aspergillus fumigatus* colonization in cystic fibrosis: implications for lung function? *Clinical Microbiology and Infection* **17**: 1381–1386.

Wang Y, Cao Y-Y, Jia X-M, Cao Y-B, Gao P-H, Fu X-P, Ying K, Chen W-S, Jiang Y-Y, 2006. Cap1p is involved in multiple pathways of oxidative stress response in *Candida albicans*. *Free Radical Biology and Medicine* **40**: 1201–1209.

Wiederhold NP, Law D, Birch M, 2017a. Dihydroorotate dehydrogenase inhibitor F901318 has potent *in vitro* activity against *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans*. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **72**: 1977–1980.

Wiederhold NP, Patterson TF, Srinivasan A, Chaturvedi AK, Fothergill AW, Wormley FL, Ramasubramanian AK, Lopez-Ribot JL, 2017b. Repurposing auranofin as an antifungal: *In vitro* activity against a variety of medically important fungi. *Virulence* **8**: 138–142.

Willger SD, Grim SL, Dolben EL, Shipunova A, Hampton TH, Morrison HG, Filkins LM, O'Toole GA, Moulton LA, Ashare A, Sogin ML, Hogan DA, 2014. Characterization and quantification of the fungal microbiome in serial samples from individuals with cystic fibrosis. *Microbiome* **2**: 40.

Williams CH, 1995. Mechanism and structure of thioredoxin reductase from *Escherichia coli*. *FASEB Journal* **9**: 1267–1276.

Williamson EC, Speers D, Arthur IH, Harnett G, Ryan G, Inglis TJ, 2001. Molecular epidemiology of *Scedosporium apiospermum* infection determined by PCR amplification of ribosomal intergenic spacer sequences in patients with chronic lung disease. *Journal of Clinical Microbiology* **39**: 47–50.

Wójtowicz H, Kloc K, Maliszewska I, Młochowski J, Pietka M, Piasecki E, 2004. Azaanalogues of ebselen as antimicrobial and antiviral agents: synthesis and properties. *Farmaco* **59**: 863–868.

Wood ZA, Poole LB, Karplus PA, 2003a. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science* **300**: 650–653.

Wood ZA, Schröder E, Robin Harris J, Poole LB, 2003b. Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins. *Trends in Biochemical Sciences* **28**: 32–40.

Xie L, Zhong W, Shi W, Sun S, 2006. Spectrum of fungal keratitis in north China. *Ophthalmology* **113**: 1943–1948.

Xisto MI, Liporagi-Lopes LC, Muñoz J, Bittencourt VC, Santos G, Dias L, Figueiredo RT, Pinto MR, Taborda C, Barreto-Bergter E, 2016. Peptidorhamnomannan negatively modulates the immune response in a scedosporiosis murine model. *Medical Mycology* **54**: 846–855.

Yang F, Li W, Derbyshire M, Larsen MR, Rudd JJ, Palmisano G, 2015. Unraveling incompatibility between wheat and the fungal pathogen *Zymoseptoria tritici* through apoplastic proteomics. *BMC Genomics* **8** (16): 362.

Yang SL, Lin C-H, Chung K-R, 2009. Coordinate control of oxidative stress tolerance, vegetative growth, and fungal pathogenicity via the AP1 pathway in the rough lemon pathotype of *Alternaria alternata*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* **74**: 100–110.

Yang SL, Yu P-L, Chung K-R, 2016. The glutathione peroxidase-mediated reactive oxygen species resistance, fungicide sensitivity and cell wall construction in the citrus fungal pathogen *Alternaria alternata*. *Environmental Microbiology* **18**: 923-935.

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

Youn HD, Kim EJ, Roe JH, Hah YC, Kang SO, 1996a. A novel nickel-containing superoxide dismutase from *Streptomyces* spp. *The Biochemical Journal* **318 (Pt 3)**: 889–896.

Youn HD, Youn H, Lee JW, Yim YI, Lee JK, Hah YC, Kang SO, 1996b. Unique isozymes of superoxide dismutase in *Streptomyces griseus*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **334**: 341–348.

Younis W, Thangamani S, Seleem MN, 2015. Repurposing non-antimicrobial drugs and clinical molecules to treat bacterial infections. *Current Pharmaceutical Design* **21**: 4106–4111.

Youseff BH, Holbrook ED, Smolnycki KA, Rappleye CA, 2012. Extracellular superoxide dismutase protects *Histoplasma* yeast cells from host-derived oxidative stress. *PLoS pathogens* **8**(15): e1002713.

Yu P-L, Wang C-L, Chen P-Y, Lee M-H, 2017. YAP1 homologue-mediated redox sensing is crucial for a successful infection by *Monilinia fructicola*. *Molecular Plant Pathology* **18**: 783–797.

Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N, 2011. Dishwashers--a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. *Fungal Biology* **115**: 997–1007.

Zámocký M, Dunand C, 2006. Divergent evolutionary lines of fungal cytochrome c peroxidases belonging to the superfamily of bacterial, fungal and plant heme peroxidases. *FEBS Letters* **580**: 6655–6664.

Zamocky M, Furtmüller PG, Obinger C, 2008. Evolution of catalases from bacteria to humans. *Antioxidants and Redox Signaling* **10**: 1527–1548.

Zámocký M, Koller F, 1999. Understanding the structure and function of catalases: clues from molecular evolution and *in vitro* mutagenesis. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* **72**: 19–66.

Zarkovic A, Guest S, 2007. *Scedosporium apiospermum* traumatic endophthalmitis successfully treated with voriconazole. *International Ophthalmology* **27**: 391–394.

Zhang L-B, Tang L, Ying S-H, Feng M-G, 2016. Distinct roles of two cytoplasmic thioredoxin reductases (Trr1/2) in the redox system involving cysteine synthesis and host infection of *Beauveria bassiana*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **100**: 10363–10374.

Zhao S, Gong H, Zhou Y, Zhang H, Cao J, Zhou J, 2016. Identification of a thioredoxin reductase from *Babesia microti* during mammalian infection. *Parasitology Research* **115**: 3219–3227.

Zhu H, Riggs AF, 1992. Yeast flavohemoglobin is an ancient protein related to globins and a reductase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**: 5015–5019.

Ziady AG, Hansen J, 2014. Redox balance in cystic fibrosis. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology* **52**: 113–123.

Ziesing S, Suerbaum S, Sedlacek L, 2016. Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5-year period in a national reference center. *Medical Mycology* **54**: 781–786.

Zoroquiain P, Alghamdi S, Arthurs B, Levin L, Sheppard DC, Ralph B, Burnier J, Burnier MN, 2017. Eyelid mycetoma masquerading as sebaceous carcinoma. *Ophthalmic Plastic and Reconstructive Surgery* **33**: S101–S104.

Zou L, Lu J, Wang J, Ren X, Zhang L, Gao Y, Rottenberg ME, Holmgren A, 2017. Synergistic antibacterial effect of silver and ebselen against multidrug-resistant Gram-negative bacterial infections. *EMBO Molecular Medicine* **9**: 1165-1178.

Zouhair R, Defontaine A, Ollivier C, Cimon B, Symoens F, Halle JN, Deunff J, Bouchara JP, 2001. Typing of *Scedosporium apiospermum* by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA. *Journal of Medical Microbiology* **50**: 925–932.

Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, Kobi A, Bouchara JP, Giraud S, 2013. Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. *Medical Mycology* **51**: 603–613.

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente dans la population caucasienne. Le genre *Scedosporium* se situe au deuxième rang parmi les champignons filamenteux isolés des expectorations dans ce contexte. Au niveau pulmonaire, les colonisations/infections entraînent le recrutement de phagocytes qui induisent un stress oxydatif normalement délétère pour les pathogènes. Pour se défendre, ceux-ci ont développé des systèmes antioxydants, notamment diverses enzymes. Ce travail de thèse visait à étudier la réponse au stress oxydatif chez *Scedosporium*. Tout d'abord, la capacité à germer en présence d'oxydants a été évaluée. Par la suite, trente-trois gènes potentiellement impliqués dans la défense contre le stress oxydatif ont été identifiés. Leur expression en présence d'oxydants et en co-cultures avec des phagocytes suggère un rôle majeur, notamment pour une catalase, une peroxyrédoxine et deux thiorédoxine réductases. Par ailleurs, un mutant défectif pour un gène codant une superoxyde dismutase (SOD) pariétale et spécifique des spores a été produit. L'auranofin, un inhibiteur des thiorédoxine réductases, présente une activité vis-à-vis des *Scedosporium* et un effet additif avec des triazolés. Un test ELISA a été développé pour le sérodiagnostic des scédosporioses, utilisant une catalase et une Cu/Zn-SOD recombinantes. Ce test sensible et spécifique permet de distinguer les infections à *Scedosporium* de celles à *Aspergillus fumigatus* et des colonisations à *Scedosporium*. Au final, ces résultats indiquent un rôle majeur des enzymes antioxydantes chez *Scedosporium,* qui pourraient être de véritables facteurs de virulence et donc de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mots clés : Mucoviscidose, *Scedosporium*, Stress oxydatif, Réponse transcriptionnelle, Sérodiagnostic, Catalase, Cu/Zn-SOD, Thiorédoxine réductases

Cystic fibrosis (CF) is the most common genetic disease in Caucasian populations. The *Scedosporium* genus ranks the second among the filamentous fungi colonizing the airways of CF patients. In the respiratory tract, colonizations/infections lead to the recruitment of phagocytes which produce an oxidative stress, usually deleterious for pathogens. To defend themselves, pathogens have developed protective antioxidant systems, especially various enzymes. This thesis aimed to study the oxidative stress response in *Scedosporium* species. First, capacity of several *Scedosporium* isolates to germinate upon oxidative stress conditions was evaluated. Then, thirty-three genes potentially involved in protection against the oxidative stress were identified. Their overexpression in response to oxidants and in co-cultures with phagocytes suggested a crucial role, especially for one catalase, one peroxiredoxin and the two thioredoxin reductases. A mutant defective for the gene encoding a superoxide dismutase (SOD) anchored to the cell wall and specific for the conidia was produced. Auranofin, a thioredoxin reductase inhibitor, exhibits little anti-*Scedosporium* activity and an additive effect with triazole drugs. An ELISA was developed for serodiagnosis of scedosporiosis, using recombinant proteins derived from one catalase and a Cu/Zn-SOD. This sensitive and specific assay allows to differentiate Scedosporium infections from *Aspergillus fumigatus* infections and *Scedosporium* colonizations. Finally, these results indicate a crucial role of antioxidant enzymes in *Scedosporium* species, which could therefore be considered as virulence factors and as possible new therapeutic targets.

Key Words

Cystic fibrosis, *Scedosporium,* Oxidative stress, Transcriptional response, Serodiagnosis, Catalase, Cu/Zn-SOD, Thioredoxin reductases

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) Cindy STAERCK .....
déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.
En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

signé par l'étudiant(e) le **20** /**10** / **2017**

Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.

Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

université angers

UNIVERSITE BRETAGNE LOIRE

université angers

Thèse de Doctorat

Cindy STAERCK

Etude de la réponse au stress oxydatif de *Scedosporium apiospermum,* un champignon filamenteux associé à la mucoviscidose

Oxidative stress response of *Scedosporium apiospermum,* a filamentous fungus associated with cystic fibrosis

Résumé

La mucoviscidose est la maladie génétique la plus fréquente dans la population caucasienne. Le genre *Scedosporium* se situe au deuxième rang parmi les champignons filamenteux isolés des expectorations dans ce contexte. Au niveau pulmonaire, les colonisations/infections entraînent le recrutement de phagocytes qui induisent un stress oxydatif normalement délétère pour les pathogènes. Pour se défendre, ceux-ci ont développé des systèmes antioxydants, notamment diverses enzymes. Ce travail de thèse visait à étudier la réponse au stress oxydatif chez *Scedosporium*. Tout d'abord, la capacité à germer en présence d'oxydants a été évaluée. Par la suite, trente-trois gènes potentiellement impliqués dans la défense contre le stress oxydatif ont été identifiés. Leur expression en présence d'oxydants et en co-cultures avec des phagocytes suggère un rôle majeur, notamment pour une catalase, une peroxyrédoxine et deux thiorédoxine réductases. Par ailleurs, un mutant défectif pour un gène codant une superoxyde dismutase (SOD) pariétale et spécifique des spores a été produit. L'auranofin, un inhibiteur des thiorédoxine réductases, présente une activité vis-à-vis des *Scedosporium* et un effet additif avec des triazolés. Un test ELISA a été développé pour le sérodiagnostic des scédosporioses, utilisant une catalase et une Cu/Zn-SOD recombinantes. Ce test sensible et spécifique permet de distinguer les infections à *Scedosporium* de celles à *Aspergillus fumigatus* et des colonisations à *Scedosporium*. Au final, ces résultats indiquent un rôle majeur des enzymes antioxydantes chez *Scedosporium,* qui pourraient être de véritables facteurs de virulence et donc de nouvelles cibles thérapeutiques.

Mots clés

Mucoviscidose, *Scedosporium*, Stress oxydatif, Réponse transcriptionnelle, Sérodiagnostic, Catalase, Cu/Zn-SOD, Thiorédoxine réductases.

Abstract

Cystic fibrosis (CF) is the most common genetic disease in Caucasian populations. The *Scedosporium* genus ranks the second among the filamentous fungi colonizing the airways of CF patients. In the respiratory tract, colonizations/infections lead to the recruitment of phagocytes which produce an oxidative stress, usually deleterious for pathogens. To defend themselves, pathogens have developed protective antioxidant systems, especially various enzymes. This thesis aimed to study the oxidative stress response in *Scedosporium* species. First, capacity of several *Scedosporium* isolates to germinate upon oxidative stress conditions was evaluated. Then, thirty-three genes potentially involved in protection against the oxidative stress were identified. Their overexpression in response to oxidants and in co-cultures with phagocytes suggested a crucial role, especially for one catalase, one peroxiredoxin and the two thioredoxin reductases. A mutant defective for the gene encoding a superoxide dismutase (SOD) anchored to the cell wall and specific for the conidia was produced. Auranofin, a thioredoxin reductase inhibitor, exhibits little anti-*Scedosporium* activity and an additive effect with triazole drugs. An ELISA was developed for serodiagnosis of scedosporiosis, using recombinant proteins derived from one catalase and a Cu/Zn-SOD. This sensitive and specific assay allows to differentiate Scedosporium infections from *Aspergillus fumigatus* infections and *Scedosporium* colonizations. Finally, these results indicate a crucial role of antioxidant enzymes in *Scedosporium* species, which could therefore be considered as virulence factors and as possible new therapeutic targets.

Key Words

Cystic fibrosis, *Scedosporium,* Oxidative stress, Transcriptional response, Serodiagnosis, Catalase, Cu/Zn-SOD, Thioredoxin reductases