DOCTORAT BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE



THESE DE DOCTORAT DE

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605 Biologie Santé Spécialité : « Microbiologie, Virologie, Parasitologie»

Par Yohann LE GOVIC

« Métabolisme du fer chez *Scedosporium apiospermum*, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose »

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 30 Novembre 2020 Unité de recherche : Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène, EA 3142, Université d'Angers Thèse N° : 181312

Rapporteurs avant soutenance :

Professeur des Universités - Praticien Hospitalier,
CHU de Rouen, Université de Rouen Normandie
Professeur des Universités - Praticien Hospitalier,
CHU de Grenoble, Université de Grenoble Alpes

Composition du Jury :

Président :	Françoise BOTTEREL	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU Henri Mondor – APHP, Université Paris Est Créteil
Examinateurs :	Laurence MILLON	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU de Besançon, Université de Bourgogne Franche-Comté
	Andrew M. BORMAN	Professor, UK National Mycology Reference Laboratory, Public Health England, United Kingdom
Dir. de thèse :	Jean-Philippe BOUCHARA	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, CHU d'Angers, Université d'Angers
Co-enc. de thèse :	Patrick VANDEPUTTE	Ingénieur, CHU d'Angers

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 creativecommons complète en français : http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier l'ensemble des membres du jury pour avoir accepté de juger mon travail : le **Pr. Françoise BOTTEREL** pour m'avoir fait l'honneur d'accepter de présider ce jury ; le **Pr. Loïc FAVENNEC** et le **Pr. Muriel CORNET**, pour le temps consacré à la lecture et l'analyse critique de ce mémoire en acceptant d'être rapporteurs ; et enfin le **Pr. Laurence MILLON** et le **Pr. Andrew BORMAN**, pour avoir accepté d'être examinateurs de ce travail.

Je souhaiterais tout particulièrement remercier mon directeur de thèse, le **Pr. Jean-Philippe BOUCHARA**, pour la confiance qu'il m'a accordée en m'offrant l'opportunité de travailler sur son sujet de coeur. Merci Jean-Philippe pour ton accompagnement tout au long de ce projet, pour ta disponibilité, pour la relevance de tes commentaires, pour ta rigueur scientifique, sans oublier l'efficacité et la justesse de tes relectures qui m'ont sans aucun doute permis de préciser mon propos. J'ai beaucoup appris à tes côtés.

Je tiens aussi à remercier chaleureusement le **Dr. Patrick VANDEPUTTE** pour avoir co-encadré (de très près) ce travail. Patrick, ces quelques lignes me paraissent dérisoires comparé à l'implication et l'engagement dont tu as fait preuve durant ces années de thèse (sans oublier le master 2). Merci d'avoir suivi l'avancée de mes expériences au quotidien, et de m'avoir fait partager ta riche expérience en biologie moléculaire sans laquelle rien n'aurait été possible. Je suis ravi d'avoir pu travailler avec toi car, outre ton appui scientifique, tu as toujours été là pour me conseiller et me soutenir dans les moments de doute. Merci pour tout.

La thèse, c'est aussi un formidable moyen d'entrer en discussion et de collaborer avec des chercheurs extérieurs. Aussi, je souhaiterais remercier le **Pr. Vladimir HAVLICEK** et le **Pr. Javier CAPILLA**, qui ont aimablement accepté d'apporter leur expertise pour l'étude de nos souches.

Mes remerciements s'adressent également au **Pr. Jérôme COLLEMARE** et au **Dr. Jean MENOTTI**, pour avoir accepté de faire partie de mon Comité de Suivi Individuel et pour leurs conseils prodigués au décours des différentes présentations.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude envers les membres du *Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène* pour leur bienveillance, leur bonne humeur et leur sympathie.

En particulier **Nicolas**, pour la relecture de nos articles et tes conseils sur la valorisation des travaux de recherche. Mais également **Sandrine** et **Amandine**, pour votre accueil et votre prévenance. Sans oublier **Charlotte**, pour ta vitalité débordante, et **Julia**, pour ta convivialité.

Je souhaite également remercier le personnel du *Laboratoire de Parasitologie – Mycologie du CHU d'Angers* de s'être toujours montré disponible et compréhensif à mon égard.

Au **Dr. Bernard CIMON**, qui m'a donné l'opportunité d'enseigner pendant 1 an la Parasitologie (et même la Biochimie !) à l'IUT d'Angers en tant que vacataire. Bernard, merci également de m'avoir fait partager ton immense expertise en matière de toxoplasmose. Je garderai un excellent souvenir de ces 4 années passées en tant que voisins de bureau.

Au **Dr. Ludovic de GENTILE**, qui a su (à juste titre) m'extirper de mon écran d'ordinateur en usant de « ses charmes » : les Parasites ! Merci pour toutes ces petites histoires qui m'ont fait tant voyager.

A **Chantal**, **Maud**, **Claire**, **Marie**, **Nadine**, qui m'ont tout de suite mis à l'aise alors que l'Anjou m'était complètement inconnu. Merci pour l'intérêt que vous portez à notre belle discipline. Surtout, ne changez rien.

Mes remerciements vont aussi au personnel du *Laboratoire de Parasitologie – Mycologie du CHU de Martinique*.

Au **Dr. Nicole DESBOIS**, qui m'a permis d'exercer la Parasitologie-Mycologie dans un environnement exceptionnel. Nicole, merci pour ton accueil et pour la grande liberté que tu m'as laissée lorsque le calendrier l'imposait. J'espère sincèrement que nous pourrons continuer à travailler ensemble dans le cadre de projets inter-établissements.

A **Jenna** ('mé ousaksé ?!') et **Nicole L** ('ki moun ki la ?'), dont le support moral a été d'un grand réconfort. J'ai désormais la chance de vous compter parmi mes amis.

A **Ugo** ("Dr. Framboise"), l'interne le plus passionné que j'aie jamais rencontré. Je te souhaite le meilleur pour la suite (mais par pitié, ne laisse pas moisir le café !).

Enfin, il est impossible de ne pas mentionner mes collègues du *Laboratoire de Parasitologie – Mycologie du CHU d'Amiens* : le **Pr. Anne TOTET**, le **Dr. Céline DAMIANI** et le **Dr. Taïeb CHOUAKI**. Merci à tous les trois pour votre gentillesse et vos encouragements dans la dernière ligne droite.

Je voudrais également remercier toutes les personnes extérieures au domaine universitaire et qui m'ont, à leur façon, apporté leur aide.

A **mes parents** : tout au long de mon cursus, vous m'avez toujours soutenu, aidé et encouragé. Vous avez su me donner toutes les chances pour réussir et je vous en suis extrêmement reconnaissant. Merci pour votre soutien affectif sans faille.

A mon frère : quelle que soit la latitude, merci pour tous ces bons moments passés et à venir.

A mes amis sportifs (mais pas que !) : **Hervine**, **Basile**, **Alexis**. Avec vous, mon esprit s'est apaisé tout autant que nos semelles se sont usées (c'est dire !). Le GR20, le Tour du Mont Blanc, et plus récemment quelques escapades dans les pitons antillais... prochaine étape ??

A mes amis du Ch'Nord : **Romain** (qui se lancera très prochainement dans la rédaction d'un mémoire portant sur l'épigénétique de "l'anicardis") et **Catherine** (qui assistera Romain dans sa quête de Prix Nobel). Longtemps éloignés, jamais oubliés. Heureux d'être à nouveau près de vous.

Papy, merci pour ton honnêteté lorsque j'ai tenté de t'expliquer le rationnel de mon sujet. Pour la peine, j'reprendrais bien un bout de viande !

Enfin, mais non des moindres, merci à toi, **Camille**. Ma Doudou, nous voilà arrivés au terme de cette deuxième thèse. Promis, il n'y en aura pas d'autre ! Merci d'avoir toujours cru en moi et de m'avoir soutenu durant ces (longs) mois de préparation. Chaque jour, je me rends compte à quel point j'ai de la chance de t'avoir à mes côtés. Merci d'être là, tout simplement.

Table des matières

LISTE DES A	BREVIATIONS	. 1
LISTE DES T	ABLEAUX ET FIGURES	. 3
INTRODUCTI	ON	. 5
ANALYSE BI	BLIOGRAPHIQUE	. 9
1. La mu	Icoviscidose	10
1.1. His	storique	10
1.2. Dé	mographie	10
1.3. Le	gène et la protéine CFTR	13
1.3.1.	Gène <i>CFTR</i>	13
1.3.2.	Protéine CFTR	13
1.3.3.	Les mutations du gène CFTR	14
1.3.4.	Répercussions d'une protéine CFTR déficiente	17
1.4. Ma	nifestations cliniques	18
1.4.1.	Atteinte du système respiratoire	20
1.4.2.	Atteinte des glandes sudoripares	21
1.4.3.	Atteinte du système digestif	21
1.4.4.	Atteinte du système reproducteur	22
1.5. Dia	agnostic	22
1.6. Av	ancées dans le traitement de la mucoviscidose	24
1.6.1.	Traitement pharmacologiques	25
1.6.2.	Thérapie génique	28
1.6.3.	Conclusion	29
1.7. Co	Ionisation et infections respiratoires	30
1.7.1.	Infections virales	30
1.7.2.	Infections bactériennes	30
1.7.3.	Colonisation et infections fongiques	32
1./.4.	Conclusion	38
2. Scedo	<i>sporium</i> et mucoviscidose	39
2.1. Re	sume	39
2.2. Ari	ticle	39
2.3. CO	nciusion	55
	ese peptialque non-ribosomique	50
3.1. III 2.2 Io	mácznismo NDDS	50
J.Z. LE	Historiaus	50
3.2.1. 2.2.2	NDDSs : yuu d'ancombla	50
2.2.2.	Structure et organisation des domaines enzymatiques	50
3.2.3.	Modes de fonctionnement des NPDSs	50
ן.ב. ק . ג א ג	NRPs · diversité de structures et d'activités	53 72
2.2.3. 4 Máta k	nolisme du fer chez les microorganismes	75
	néralités sur le fer	75
4.2 1/2	assimilation et le stockage du fer chez les microorganismes .	, J 76

4.2.1	1. Assimilation médiée par les sidérophores	76
4.2.2	2. Les autres systèmes d'assimilation du fer	83
4.2.3	Stockage et remobilisation du fer intracellulaire	85
4.3.	Organisation génomique des gènes impliqués dans le métaboli	sme du fer 86
4.4.	Régulation du métabolisme du fer chez les champignons	
4.5.	Rôle du métabolisme du fer dans la pathogénie	
4.5.1	1. Rôle des sidérophores	90
4.5.2	2. Rôle de la RIA	91
4.6.	Disponibilité du fer dans la mucoviscidose	
4.7.	Applications médicales des sidérophores	
4.7.1	1. Applications diagnostiques	93
4.7.2	2. Applications thérapeutiques	95
TRAVAIL	EXPERIMENTAL	97
1. An	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du	fer chez S.
1. An <i>apiospe</i>	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du ermum	fer chez <i>S.</i>
 An apiospe 1.1. 	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du ermum Résumé	l fer chez <i>S.</i> 99 99
1. An <i>apiospe</i> 1.1. 1.2.	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du ermum Résumé Article	fer chez S. 99
 An apiospe 1.1. 1.2. Et 	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du ermum Résumé Article. ude in silico du potentiel de synthèse NRPS chez S. apiosp	fer chez S. 99 99 100 99 100
 An apiospe 1.1. 1.2. 2.1. 	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du ermum Résumé Article cude in silico du potentiel de synthèse NRPS chez S. apiosp Résumé	fer chez S. 99
 An apiospe 1.1. 1.2. Etu 2.1. 2.2. 	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du ermum Résumé Article. cude in silico du potentiel de synthèse NRPS chez S. apiosp Résumé Article.	fer chez S. 99
 An apiospe 1.1.	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du ermum Résumé Article. ude in silico du potentiel de synthèse NRPS chez S. apiosp Résumé Article. aractérisation fonctionnelle du gène sidD	fer chez S. 99 100 permum .118 118 119 135
 An apiospe 1.1. 1.2. 2.1. 2.2. Ca	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du ermum Résumé Article ude in silico du potentiel de synthèse NRPS chez S. apiosp Résumé Article aractérisation fonctionnelle du gène sidD	fer chez S. 99
 An apiospe 1.1. 1.2. Etu 2.1. 2.2. Ca 3.1. 3.2. 	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du ermum Résumé Article. Sude in silico du potentiel de synthèse NRPS chez S. apiosp Résumé Article. Article . Article. Article.	fer chez S. 99 100 99 100 99 110 99 110 118 119 119 135 135 136
 An apiospe 1.1. 1.2. Et 2.1. 2.2. Ca 3.1. 3.2. DISCUSSI 	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du ermum Résumé Article. sude in silico du potentiel de synthèse NRPS chez S. apiosp Résumé Article. aractérisation fonctionnelle du gène sidD Résumé Article. ION ET PERSPECTIVES.	fer chez S. 99
 An <i>apiospe</i> 1.1. 1.2. Etr 2.1. 2.2. Ca 3.1. 3.2. DISCUSSI BIBLIOGE 	nalyse génomique et transcriptomique du métabolisme du <i>Résumé</i> <i>Article</i> <i>sude in silico</i> du potentiel de synthèse NRPS chez <i>S. apiosp</i> <i>Résumé</i> <i>Article</i> <i>aractérisation fonctionnelle du gène sidD</i> <i>Résumé</i> <i>Article</i> <i>Article</i> <i>Article</i> <i>Article</i>	fer chez S. 99 99 99

Liste des abréviations

ABC	ATP Binding Cassette
ABPA	Aspergillose Broncho-Pulmonaire Allergique
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
ADNr	Acide DésoxyriboNucléique ribosomal
AMPc	Adénosine MonoPhosphate cyclique
ARN	Acide RiboNucléique
ARNm	Acide RiboNucléique messager
ATP	Adénosine TriPhosphate
BLASTp	Basic Local Alignment Search Tool protein
CF	Cystic Fibrosis
CFEM	Common in several Fungal Extracellular Membrane protein
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CRCM	Centre de Ressources et de Compétences de la Mucoviscidose
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
∆F508	Délétion de la phénylalanine en position 508 du gène CFTR
ENaC	Epithelial Na ⁺ Channel
ETP	EpidiThiodioxoPipérazine
Fe ²⁺	fer ferreux (Fe(II))
Fe ³⁺	fer ferrique (Fe(III))
FsC	Fusarinine C
HAS	Haute Autorité de Santé
HR	Homologous Recombination
IHEM	Institute of Hygiene and Epidemiology Mycology section
ITS	Internal Transcribed Spacer
MFS	Major Facilitator Superfamily
Mir	Major facilitator Iron Regulated
NBD	Nucleotide Binding Domain
NHEJ	Non-Homologous End Joining
NRP	Non-Ribosomal Peptide
NRPS	Non-Ribosomal Peptide Synthetase
ORCC	Outwardly Rectifying Chloride Channel
PAP	Polypeptide d'Activation Pancréatique
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET/CT	Positron Emission Tomography/Computed Tomography
РКА	Protéine Kinase AMPc dépendante
PPant	PhosphoPantéthéine
RIA	Reductive Iron Assimilation

ROMK	Renal Outer Medullary Potassium channel
RT-qPCR	Reverse Transcriptase-quantitative PCR
SARM	Staphylococcus aureus résistant à la méthicilline
SASM	Staphylococcus aureus sensible à la méthicilline
SIT	Siderophore Iron Transporter
SODI	Syndrome d'Occlusion Distale de l'Intestin
TAFC	TriAcétyl Fusarinine C
tBLASTn	protein versus translated nucleotide Basic Local Alignment Search Tool
TIR	Trypsine Immuno-Réactive
UFC	Unité Formant Colonie
VEMS	Volume Expiratoire Maximal par Seconde
VRS	Virus Respiratoire Syncytial

Liste des tableaux et figures

Liste des tableaux

Tableau 1. Evolution des troubles liés à la mucoviscidose en fonction de l'âge des patients, d'après O'Sulliva
et Freedman [47], Elborn [26] et Bellis <i>et al.</i> [9]1
Tableau 2. Séquences signatures caractéristiques des principaux domaines impliqués dans la synthèspeptidique non-ribosomique, d'après Schwarzer <i>et al.</i> [192].
Tableau 3. Le code conférant la spécificité des domaines A, d'après Stachelhaus et al. [199]6
Tableau 4. Structure et affinité des sidérophores pour le fer ferrique. 7

Liste des figures

Figure 1. Evolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose et proportion des enfants et adultes
impactés par la maladie ; (A) en France, et (B) en Europe, d'après Bellis et al. [9] et Zolin et al. [23]11
Figure 2. Prévalence de la mucoviscidose dans le monde, d'après Lopes-Pacheco [29]
Figure 3. Prévalence de la mucoviscidose par département en France, d'après Bellis et al. [9] 12
Figure 4. Localisation chromosomique et organisation du gène CFTR, d'après Romey [30]13
Figure 5. Organisation structurale de la protéine CFTR, d'après Romey [30]
Figure 6. Mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal CFTR, d'après Gadsby et al. [33]14
Figure 7. Répartition des mutations du gène CFTR (adaptée de la base de données genet.sickkids)
Figure 8. Classification des mutations du gène <i>CFTR</i> selon leur impact sur la protéine CFTR, d'après Boyle et De Boeck [41]
Figure 9. Physiopathologie de l'atteinte pulmonaire dans la mucoviscidose, d'après Ratjen et Döring [46] 18
Figure 10. Principaux organes touchés par la mucoviscidose, d'après Paranjape et Mogayzel [48] 20
Figure 11. Algorithme actuel pour le dépistage de la mucoviscidose en France, d'après Munck et al. [65] 23
Figure 12.Evolution de l'espérance de vie dans la mucoviscidose suite à l'introduction des différentesthérapeutiques, d'après Elborn [71].24
Figure 13. Thérapeutiques innovantes dans la mucoviscidose
Figure 14. Amélioration moyenne du VEMS en valeur absolue (VA) sous modulateurs
Figure 15. Répartition des principaux germes respiratoires isolés dans le contexte de mucoviscidose en France, adapté de Bellis <i>et al.</i> [9]
Figure 16. Biodiversité fongique dans la mucoviscidose, adapté de Chmiel <i>et al.</i> [105]

Figure 17. Représentation schématique d'une NRPS avec les domaines de base pour l'initiation, l'élongation et la terminaison de l'assemblage peptidique
Figure 18. Réaction d'activation d'un acide aminé sélectionné par un domaine A, d'après Kasai et al. [193] 59
Figure 19. Différents états conformationnels adoptés par les domaines A, d'après Yonus et al. [197] 60
Figure 20. Représentation spatiale du site d'activation de la phénylalanine par PheA, d'après Conti <i>et al.</i> [194].
Figure 21. Fixation d'un monomère activé sur le bras PPant d'un domaine T, d'après Kasai et al. [193] 64
Figure 22. Etablissement d'une liaison peptidique entre deux substrats aminoacyl-thioester au niveau du premier domaine de condensation d'une NRPS, adapté de Finking et Marahiel [190]
Figure 23. Réaction d'hydrolyse et de cyclisation catalysée par le domaine thioestérase (Te) lors de la libération de la surfactine, d'après Sieber et Marahiel [212]
Figure 24. Biosynthèse linéaire (type A) : exemple de l'ACV, d'après Mootz et al. [223]
Figure 25. Biosynthèse itérative (type B) : exemple de l'entérobactine, d'après Mootz et al. [223]70
Figure 26. Biosynthèse non-linéaire (type C) : exemple de la vibriobactine, d'après Mootz et al. [223] 71
Figure 27. Représentation schématique du mode de synthèse itératif, alternatif et optionnel des amonabactines, d'après Esmaeel <i>et al.</i> [198]72
Figure 28. Structure (A) et activité (B) des peptides non-ribosomiques répertoriés dans Norine
Figure 29. Mécanismes d'acquisition du fer par les microorganismes, adapté de Kronstad et al. [261]
Figure 30. Les différentes classes de sidérophores, adapté de Wilson <i>et al.</i> [263]77
Figure 31. Principaux représentants de chaque famille de sidérophore fongique, adapté de Haas [228] 79
Figure 32. Biosynthèse des sidérophores chez Aspergillus fumigatus, d'après Haas [228] 80
Figure 33. Organisation des gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport des sidérophores chez <i>A. nidulans</i> (FGSC A4), <i>A. fumigatus</i> (Af293) and <i>A. niger</i> (CBS 513.88), d'après Franken <i>et al.</i> [270]
Figure 34. Régulation du métabolisme du fer par SreA et HapX chez Aspergillus spp., adapté de Haas [296]. 88
Figure 35. Rôle des sidérophores et de la RIA dans la virulence d'A. fumigatus, d'après Schrettl et al. [8] 90
Figure 36. Exemples d'applications potentielles des sidérophores, d'après Petrik et al. [339]
Figure 37. Illuminer les zones infectées grâce aux sidérophores, adapté de Luptáková et al. [349]

Introduction

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez Scedosporium apiospermum, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose La mucoviscidose, ou fibrose kystique (en anglais : *cystic fibrosis*), est la plus fréquente des maladies génétiques héréditaires dans la population caucasienne [1]. Elle est liée à des mutations du gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) codant un canal ionique dont le rôle est de réguler le transport du chlore au niveau de la membrane apicale des cellules épithéliales. Son dysfonctionnement entraîne la déshydratation et l'épaississement du mucus bronchique, ce qui engendre la paralysie des cils vibratiles et l'altération de la clairance muco-ciliaire. En conséquence, les voies respiratoires des patients sont fréquemment colonisées par des microorganismes, au premier rang desquels figurent différentes espèces bactériennes, notamment *Pseudomonas aeruginosa.* Cependant, l'allongement de l'espérance de vie des patients qui a résulté des progrès réalisés dans la prise en charge des infections respiratoires bactériennes, mais aussi de l'amélioration du statut nutritionnel des patients et de la mise en place d'un dépistage précoce de la maladie, s'est accompagnée d'une augmentation de la fréquence des pathogènes fongiques, qui peuvent eux aussi déterminer des infections respiratoires et participent à la dégradation de la fonction pulmonaire. Si *Aspergillus fumigatus* reste l'espèce la plus fréquente, le genre *Scedosporium* se classe aujourd'hui au deuxième rang des champignons filamenteux responsables de colonisation des voies aériennes chez les patients atteints de mucoviscidose [2].

Les espèces du genre *Scedosporium* sont des champignons filamenteux habituellement saprophytes, retrouvés dans l'environnement, principalement dans des habitats fortement impactés par l'homme (terrains agricoles, boues de stations d'épuration, vase d'estuaires...), en lien avec leur capacité à utiliser les hydrocarbures aliphatiques ou aromatiques comme source de carbone. Aussi, ces moisissures ont été détectées dans le sol et les végétaux en cours de décomposition, avec des concentrations en spores pouvant atteindre jusqu'à 1000 UFC/g en milieu urbain ou industriel [3,4]. Les *Scedosporium* sont considérés comme des pathogènes opportunistes, et sont difficiles à éradiquer compte-tenu de leur faible sensibilité intrinsèque aux antifongiques actuellement disponibles. Chez l'homme, ces champignons peuvent être responsables d'infections consécutives à une inoculation traumatique d'éléments fongiques (mycétomes sous-cutanés, infections ostéo-articulaires,...), ainsi que d'atteintes de l'appareil respiratoire résultant vraisemblablement de l'inhalation de spores en suspension dans l'air (sinusites, mycétomes pulmonaires). Par ailleurs, ils connaissent depuis le début des années 2000 un véritable regain d'intérêt compte tenu de leur reconnaissance, à l'échelle mondiale, en tant qu'agents responsables d'authentiques infections respiratoires chez les patients atteints de mucoviscidose, et d'infections disséminées potentiellement létales en cas d'immunodépression (en particulier, en cas de transplantation pulmonaire ou cœur-poumon).

Les données disponibles concernant les facteurs de pathogénicité des *Scedosporium* restent relativement limitées. Néanmoins, les travaux réalisés au sein du Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP, EA3142) ont montré qu'un certain nombre d'acteurs traditionnellement retrouvés chez les pathogènes fongiques (*e.g.* mélanine, enzymes glycoprotéolytiques, enzymes du stress oxydatif) pourraient être impliqués dans la virulence des *Scedosporium*. Par ailleurs, la mise à disposition récente de la séquence complète du génome des espèces les plus fréquemment rencontrées en mycologie médicale (*Scedosporium apiospermum, Scedosporium aurantiacum* et *Scedosporium boydii*) [5–7] permet d'envisager des progrès plus rapides dans la compréhension des mécanismes pathogéniques de ces champignons.

L'un des processus fondamentaux dans la physiologie et la pathogénie d'un organisme fongique consiste dans l'acquisition du fer extracellulaire. Le fer est en effet un élément indispensable pour de nombreuses voies métaboliques essentielles (respiration oxydative, biosynthèse des stérols, d'ADN et d'acides aminés, dégradation des radicaux oxygénés). Néanmoins, en dépit de son abondance dans l'environnement, les microorganismes sont incapables d'assimiler directement le fer. Dans ce but, ils produisent des petites molécules, appelées sidérophores, qui sont excrétées. Ces métabolites vont séquestrer le fer, et permettre ainsi son acquisition par le microorganisme via des transporteurs membranaires spécifiques du complexe ferrisidérophore. Quatre classes de sidérophores sont connues, mais les sidérophores produits par les Ascomycètes sont majoritairement des hydroxamates qui sont tous issus de la synthèse peptidique non ribosomale. Cette synthèse s'effectue grâce à des protéines modulaires de très haut poids moléculaire appelées NRPSs (Non-Ribosomal Peptide Synthetases). Ces enzymes sont souvent codées par des gènes organisés en cluster, c'est-à-dire localisés dans des régions du génome regroupant d'autres gènes consacrés à une même voie métabolique. Dans le cas des sidérophores, ces clusters contiennent par conséquent non seulement le gène codant la NRPS, mais également ceux nécessaires aux éventuelles modifications du peptide synthétisé (hydroxylation, acylation, glycosylation, voire halogénation), ainsi que ceux codant le ou les transporteurs du sidérophore synthétisé, et parfois même des gènes contrôlant l'expression des gènes au sein du cluster (facteur de transcription).

Outre son rôle essentiel pour la croissance et la survie du champignon, l'assimilation du fer *via* les sidérophores constitue un facteur déterminant de la virulence. A titre d'exemple, le blocage de la voie de biosynthèse des sidérophores chez *Aspergillus fumigatus* entraîne une perte totale de la virulence dans un modèle murin d'aspergillose invasive [8]. Ainsi, la description des mécanismes qui sous-tendent l'acquisition du fer chez *Scedosporium*, qui constitue l'objet de cette thèse, permettrait de dévoiler l'une des stratégies probablement développées par ces champignons pour s'installer et persister dans les voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose, pourtant colonisées dès le plus jeune âge par une multitude d'autres micro-organismes eux-mêmes dépendants vis-à-vis du fer. Par ailleurs, les protéines NRPS qui sont chargées d'orchestrer la biosynthèse des sidérophores (mais aussi d'autres produits du métabolisme secondaire) sont totalement absentes chez l'homme, ce qui permet d'envisager de nouvelles applications diagnostiques ou thérapeutiques pour ces champignons difficiles à isoler et en même temps très peu sensibles aux antifongiques actuels.

Analyse bibliographique

1. La mucoviscidose

La mucoviscidose, également appelée fibrose kystique (CF pour *cystic fibrosis*), est la maladie génétique la plus fréquemment observée dans les populations occidentales (Europe, Amérique du Nord, Australie) [1]. Il s'agit d'une maladie héréditaire à transmission autosomique récessive : seuls les individus porteurs de 2 allèles défectueux – l'un provenant du père, l'autre de la mère – sont atteints. La mucoviscidose se manifeste par la sécrétion d'un mucus anormalement épais et visqueux engendrant des troubles de la respiration et de la digestion. Bien que sa prise en charge se soit considérablement améliorée au cours des dernières décennies (en particulier, dans les pays développés), la mucoviscidose reste une pathologie chronique évolutive grave, potentiellement létale [9], alors qu'aucun traitement curatif n'est disponible à ce jour.

1.1. Historique

La mucoviscidose est connue depuis fort longtemps. Au Moyen Âge, on craignait le sort funeste du nouveau-né dont la mère remarquait le goût salé laissé par un baiser sur le front de l'enfant. Ainsi pendant des siècles, on pensait que la maladie était liée à la sorcellerie et au « mauvais œil », et ce n'est qu'en 1936 que le Dr. Guido Fanconi, un pédiatre suisse, décrit la maladie chez des enfants supposés atteints de maladie coeliaque et la nomma « fibrose kystique du pancréas » [10]. Deux ans plus tard, une pédiatre américaine, le Dr. Dorothy Andersen, décrit les caractéristiques cliniques et histologiques de la maladie, qu'elle considère alors comme une entité à part entière [11]. Le terme *mucoviscidosis*, quant à lui, fut utilisé pour la première fois en 1945 par le Dr. Sydney Farber [12] afin de corriger la définition d'Andersen, qu'il jugeait trop focalisée sur le pancréas. Farber était en effet convaincu que la maladie était due à la diffusion généralisée de mucus visqueux, ce qui sera confirmé par la suite.

L'aspect héréditaire de la maladie et le mode de transmission récessif furent suggérés en 1946 par Andersen et Hodges [13]. En 1948, la vague de chaleur qui frappa New York révéla que de nombreux enfants souffrant de prostration étaient atteints de mucoviscidose [14]. Fasciné par cet événement, le Dr. Paul di Sant'Agnese démontra cinq ans plus tard que la sueur de ces enfants était caractérisée par un excès de sodium et de chlore [15]. Cette découverte majeure a permis d'utiliser, dès 1959, le test à la sueur comme test de diagnostic pour la mucoviscidose. Au début des années 1980, Paul M. Quinton fut le premier à montrer que l'augmentation des électrolytes dans la sueur était due à un défaut de perméabilité aux ions chlorures au niveau des glandes sudoripares [16,17]. Le gène responsable de la maladie sera finalement identifié en 1989 [18–20].

1.2. Démographie

En France, la mucoviscidose touche un enfant sur 4700 naissances [21], et la fréquence des hétérozygotes, « porteurs sains » de la maladie, est d'environ 1/25 [22]. Parmi les 180 nouveaux diagnostics réalisés en France en 2017, 111 (61,7%) étaient des enfants nés dans l'année [9]. La même année, 7114 patients étaient recensés en France, contre 47742 en Europe [23] et environ 75000 dans le monde [24]. La maladie affecte les hommes et les femmes sans distinction.

Auparavant, la mucoviscidose était une maladie touchant majoritairement les enfants. Le pronostic vital était sombre avec une mortalité quasi certaine à l'âge d'un an [25]. Actuellement, avec la mise en place du dépistage néonatal systématique, la kinésithérapie respiratoire, et l'amélioration du statut nutritionnel et des thérapeutiques antimicrobiennes [24], l'espérance de vie d'un patient atteint de mucoviscidose est supérieure à 40 ans [23,26]. Selon une étude récente, l'âge médian de survie dépasserait même les 50 ans au Canada [27]. En conséquence, la mucoviscidose impacte désormais principalement les adultes [26], qui représentent 55,9% de l'effectif total en France (Figure 1A) et 52,5% en Europe (Figure 1B). Selon une étude prospective sur l'évolution de la population, cette tendance devrait s'accentuer, notamment en France où est prévue une augmentation de la population adulte de 75,7% à l'horizon 2025, contre 18,4% pour la population pédiatrique [28].



Figure 1. Evolution du nombre de patients atteints de mucoviscidose et proportion des enfants et adultes impactés par la maladie ; **(A)** en France, et **(B)** en Europe, d'après Bellis *et al.* [9] et Zolin *et al.* [23].

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez Scedosporium apiospermum, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose La prévalence de la mucoviscidose est variable à l'échelle de la planète (Figure 2), mais également entre régions au sein d'un même pays. Par exemple en France, la proportion de patients atteints de mucoviscidose est plus élevée à l'Ouest (particulièrement en Bretagne), au Nord et au Sud-Est du pays, ainsi que sur l'île de la Réunion (Figure 3).



Figure 2. Prévalence de la mucoviscidose dans le monde, d'après Lopes-Pacheco [29]. Echelle de couleur allant du jaune clair au bleu foncé : nombre de cas pour 100 000 habitants. En gris, pays ne possédant pas de registre de cas.



Figure 3. Prévalence de la mucoviscidose par département en France, d'après Bellis et al. [9].

1.3. Le gène et la protéine CFTR

1.3.1. Gène CFTR

Le gène responsable de la mucoviscidose est dénommé *CFTR* (<u>*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*). Localisé au niveau du bras long du chromosome 7 (segment q31.2), il est constitué de 27 exons et s'étend sur 250 kb (**Figure 4**) [30]. Le transcrit *CFTR*, quant à lui, présente une séquence de 6,5 kb incluant les régions 5' et 3' non codantes.</u>



Figure 4. Localisation chromosomique et organisation du gène CFTR, d'après Romey [30].

1.3.2. Protéine CFTR

La glycoprotéine CFTR, codée par le gène éponyme, est un canal ionique appartenant à la superfamille des transporteurs ABC (<u>ATP binding cassette</u>) [31]. Cette protéine monomérique de 1480 acides aminés est constituée de deux motifs transmembranaires (TM) identiques, contenant chacun six hélices α associées à un domaine de liaison à l'ATP (*NBD* : <u>N</u>ucleotide <u>binding domain</u>), et reliés par un domaine de régulation cytoplasmique (Domaine R) (**Figure 5**). Ce dernier, riche en résidus séryl, est la cible de phosphorylation par la PKA (<u>p</u>rotéine <u>k</u>inase <u>A</u>MPc dépendante) [19].



Figure 5. Organisation structurale de la protéine CFTR, d'après Romey [30].

Les mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal CFTR sont représentés schématiquement dans la **Figure 6**. Initialement, l'augmentation intracellulaire du taux d'AMPc active les protéines kinases A, qui vont phosphoryler les motifs sérine du domaine R. Ensuite, deux molécules d'ATP se fixent sur les domaines cytoplasmiques NBD1 et NBD2, entraînant la dimérisation. Un signal est alors transmis à la région transmembranaire, ce qui permet l'ouverture du canal. Lorsque la molécule d'ATP fixée au domaine NBD2 est hydrolysée, les deux domaines NBD n'interagissent plus ensemble et le canal se ferme. Ainsi, à la différence des autres transporteurs ABC, la protéine CFTR n'utilise pas l'ATP comme source d'énergie pour le transport de molécules, mais pour son changement de conformation [32].



Figure 6. Mécanismes d'ouverture et de fermeture du canal CFTR, d'après Gadsby *et al.* [33]. Note : le domaine R préalablement phosphorylé n'est pas représenté sur ce schéma.

La protéine CFTR s'exprime dans la membrane apicale des cellules épithéliales de différents tissus (poumon, sinus, glandes sudoripares, pancréas, foie, organes reproducteurs) [34]. Il s'agit d'un canal bidirectionnel dont la fonction principale est le transport des ions chlorures (Cl⁻) du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire. Au niveau des glandes sudoripares, le canal CFTR assure la réabsorption de ces mêmes ions [35], ce qui explique les taux anormalement élevés de chlore dans la sueur des patients atteints de mucoviscidose.

La sélectivité de la protéine CFTR pour les chlorures n'est pas absolue. En effet, ce canal est également permissif pour les ions bicarbonates (HCO₃⁻), et de façon plus anecdotique, pour d'autres halogénures tels que les ions iodures (I⁻), bromures (Br⁻) et fluorures (F⁻) [36]. En outre, sa perméabilité au glutathion lui confère un rôle protecteur contre les radicaux libres [37]. Diverses autres fonctions ont été attribuées à la protéine CFTR, notamment la régulation de certains canaux tels que le canal sodique ENaC (*Epithelial Na⁺ Channels*), le canal potassique ROMK (*Renal Outer Medullary K⁺ channels*), ou encore le canal chlorure ORCC (*Outwardly Rectifying Cl⁻ Channels*) [38–40]. L'altération de ces échanges explique les particularités du mucus extracellulaire dans la mucoviscidose (déshydratation, hyperviscosité, acidose).

1.3.3. Les mutations du gène CFTR

a) Répartition

La mucoviscidose est liée à la présence de deux allèles mutés du gène *CFTR*. A ce jour, plus de 2000 altérations moléculaires ont été identifiées sur ce gène (<u>http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/app</u>), mais seule une vingtaine d'entre elles ont une fréquence supérieure à 0,1% dans la population atteinte. L'exemple le plus probant est la mutation correspondant à la délétion d'un triplet nucléotidique CTT situé dans l'exon 10 et entraînant une délétion de la phénylalanine en position 508 dans la protéine CFTR (Phe508del ou F508del, appelée Δ F508 dans la nomenclature la plus récente). Il s'agit, en effet, de la mutation la plus fréquemment identifiée dans le monde (près de 90% de la population atteinte présenterait au moins un allèle muté sur cette position, et 50% de ces individus sont homozygotes pour cette mutation), alors que les mutations de type

insertion/délétion sans décalage du cadre de lecture (dont fait partie la mutation Δ F508) ne représentent que 2% de l'ensemble des mutations décrites sur le gène *CFTR* (Figure 7). En France et en Europe, plus de 80% des malades portent au moins un allèle impacté par cette mutation [9,23].



Figure 7. Répartition des mutations du gène CFTR (adaptée de la base de données genet.sickkids).

Au total, 2088 mutations différentes étaient identifiées au 29/04/2020. La majorité de ces mutations (~39%) correspond à des faux-sens (substitution d'un nucléotide responsable d'un changement d'acide aminé), suivis d'insertions/délétions entraînant un décalage du cadre de lecture (~16%). Des altérations impactant les mécanismes d'épissage (~11%) ont également été décrites, tout comme les mutations nonsens (mutation ponctuelle faisant apparaître un codon stop). Les insertions/délétions ne modifiant pas le cadre de lecture comptent pour environ 2% des mutations décrites. A noter que près de 13% des mutations correspondent à des variants réputés sans implication dans le développement de la maladie.

b) Classification moléculaire

Les mutations du gène *CFTR* sont classées en 6 catégories selon leur impact sur la protéine correspondante **(Figure 8)** (pour revue ; Elborn [26], Boyle *et al*. [41] et Amaral [42])

- Classe I : Absence de synthèse protéique. Il s'agit le plus souvent de mutations non-sens (G542X, R553X et W1282X) ou d'insertions/délétions entraînant un décalage du cadre de lecture (621+1G→T) à l'origine de l'apparition prématurée d'un codon stop, altérant *de facto* le processus de synthèse de la protéine CFTR. En effet, la transcription de la séquence mutée produit un ARNm tronqué et instable, donc rapidement dégradé. Cette catégorie inclut également les délétions totales ou partielles du gène *CFTR* (*CFTR* del2,3). La conséquence moléculaire est l'absence totale d'expression de la protéine CFTR à la surface cellulaire. Ces mutations sont retrouvées chez environ 10% des patients [43].
- Classe II : Défaut de maturation et d'adressage de la protéine CFTR. Ces mutations comptent parmi les plus fréquentes au sein de la population mucoviscidosique. Il s'agit essentiellement de mutations non-sens (ΔF508, ΔI507) ou faux-sens (N1303K, R560T, G85E), entraînant un défaut de repliement de la protéine qui, bien que synthétisée entièrement, sera retenue au niveau du réticulum endoplasmique, puis dégradée par le protéasome, faute de glycosylation. Cette altération du trafic intracellulaire aboutit à la quasi-absence de protéine exprimée à la membrane.

- Classe III : Défaut de régulation du canal. Cette catégorie regroupe des mutations faux-sens touchant les domaines de liaison à l'ATP (domaines NBD1 et NBD2). Pour mémoire, les 2 domaines NBD doivent recruter chacun une molécule d'ATP pour permettre l'ouverture du canal. Ici, la protéine anormale atteint donc sa localisation membranaire, mais elle n'est pas fonctionnelle. Cette classe de mutation « gating » est présente chez 4 à 5% des patients dans le monde et la plus fréquente correspond à la substitution G551D, observée chez au moins 3% des patients atteints.
- Classe IV : Défaut de sélectivité et de conductance. Ce sont le plus souvent des mutations fauxsens associées aux domaines transmembranaires formant le pore du canal. La conséquence est une diminution de la sélectivité et de la conductance du canal ionique, qui conserve malgré tout une activité partielle. C'est le cas avec la mutation R117H, observée chez environ 2% des malades.
- Classe V: Diminution de la synthèse protéique. Cette catégorie regroupe des mutations du promoteur qui diminuent la transcription du gène CFTR [44] ainsi que des mutations introniques affectant un site d'épissage (e.g. mutation 5T) avec pour conséquence la production conjointe d'un transcrit sauvage et aberrant. Ces mutations engendrent une production réduite de protéine CFTR, pourtant complètement fonctionnelle une fois adressée à la membrane.
- Classe VI : Diminution de stabilité de la protéine. Dans cette catégorie figurent quelques mutations rarissimes donnant lieu à une protéine fonctionnelle, mais avec un temps de résidence dans la membrane réduit.

Au total, les classes I à III qui comprennent les mutations les plus fréquemment observées dans la population mondiale aboutissent à une activité du canal CFTR nulle ou minimale, d'où un phénotype « sévère » presque toujours associé à une insuffisance pancréatique exocrine, à laquelle se surajoute parfois un risque de cirrhose ou de diabète. En revanche, les mutations des classes IV à VI permettent de maintenir une activité résiduelle significative du canal CFTR ; l'atteinte organique est alors généralement moins importante. Conceptuellement pratique, cette catégorisation en six classes de mutations présente néanmoins des limites. En effet, (i) elle est simpliste : une mutation peut entraîner des conséquences qui relèvent de plusieurs classes (*e.g.* la mutation Δ F508 classiquement associée à la classe II engendre également des défauts qui s'apparentent aux mutations des classes III et VI) ; (ii) une même conséquence (*e.g.* dégradation accélérée pendant le processus de maturation) peut relever de mécanismes différents, et deux mutations d'une même classe ne répondront pas forcément de la même manière à une même médication ; (iii) le génotype *CFTR* n'est pas suffisant à lui seul pour prédire l'évolution respiratoire qui est également influencée par des facteurs environnementaux (dont la qualité des soins) et d'autres facteurs génétiques (« gènes modificateurs ») ; (iv) la plupart des mutations identifiées sont rares, voire rarissimes, et leurs conséquences exactes ne sont pas connues de manière précise.



Figure 8. Classification des mutations du gène *CFTR* selon leur impact sur la protéine CFTR, d'après Boyle et De Boeck [41].

1.3.4. Répercussions d'une protéine CFTR déficiente

La mutation du gène *CFTR* entraîne la synthèse d'une protéine déficiente. Cette altération provoque des anomalies dans les flux d'ions Cl⁻ et Na⁺ (hyper-réabsorption de fluides et de Na⁺), qui elles-mêmes entraînent la déshydratation du mucus qui s'épaissit, devient visqueux et s'accumule notamment au niveau des voies respiratoires. La clairance muco-ciliaire (mécanisme par lequel les particules inhalées supérieures à une certaine taille sont propulsées vers l'extérieur) est donc fortement affectée chez les patients mucoviscidosiques [26,41,45]. Des anomalies dans le transport des ions bicarbonates sont également rapportées, ce qui engendre des modifications du pH à la surface de l'épithélium pulmonaire. En conséquence, les peptides antimicrobiens synthétisés par les cellules épithéliales voient leur action pH-dépendante s'atténuer, ce qui explique en partie l'apparition d'infections bactériennes chez ces patients. Les bicarbonates influent également sur les qualités rhéologiques du mucus [26]. Ainsi, les microorganismes se retrouvent piégés dans le mucus de l'épithélium respiratoire et ne peuvent être évacués, faute d'une clairance muco-ciliaire efficace. Les infections entraînent alors l'inflammation des voies respiratoires qui perdurera et favorisera le développement de nouvelles infections (**Figure 9**).



Figure 9. Physiopathologie de l'atteinte pulmonaire dans la mucoviscidose, d'après Ratjen et Döring [46].

Le mucus est représenté en bleu ciel ; les cellules épithéliales sont représentées par les rectangles jaunes ; les cellules sécrétrices de mucus sont représentées sous forme de gouttelettes bleues ; la pression partielle en oxygène est indiquée sur la droite de chaque illustration : en rose/rouge s'il n'y a pas d'hypoxie et en bleu si l'environnement est hypoxique. **(A)** Chez un individu sain, les échanges d'ions Na⁺ et Cl⁻ sont équilibrés permettant une hydratation normale du mucus, présent en fine couche. La clairance muco-ciliaire est efficace. **(B-F)** A contrario, chez un individu atteint de mucoviscidose. **(B)** Le mucus devient épais et visqueux suite à l'hyposécrétion d'ions Cl⁻ (déficience CFTR) et l'hyperabsorption d'ions Na⁺ (dérépression des canaux ENaC) qui entraînent une absorption anormale d'eau vers le compartiment intracellulaire et donc la déshydratation du mucus. La clairance muco-ciliaire est altérée. **(C)** La production et surtout l'accumulation excessive de mucus obstruent progressivement les voies aériennes, ce qui compromet les échanges d'oxygène. **(D)** L'hypoxie est détectée par les bactéries qui pénètrent dans le mucus et y restent piégées. **(E)** Dans la profondeur du mucus, les bactéries s'adaptent aux niches hypoxiques pour s'y développer et engendrer une colonisation voire une infection. **(F)**. Cette infection engendre une réponse inflammatoire exacerbée au niveau des voies aériennes, avec un afflux massif de polynucléaires neutrophiles dont l'action n'est pas optimale en raison de l'hypoxie du mucus. Ce processus inflammatoire devient chronique et provoque la destruction du tissu pulmonaire (non illustrée sur ce schéma), entraînant ainsi une diminution progressive de la fonction respiratoire.

1.4. Manifestations cliniques

Les manifestations cliniques de la mucoviscidose concernent tous les organes munis d'un épithélium tels que les poumons, le pancréas, le foie, les intestins, les glandes sudoripares, ou encore le tractus génital [9]. Il s'agit d'une maladie évoluant de façon chronique ; l'obstruction progressive des organes, associée à une inflammation persistante et à des infections à répétition, entraîne l'altération partielle, puis totale et définitive, des fonctions physiologiques assurées par ces organes. La présentation clinique est extrêmement variable, y compris entre individus portant des mutations de classe identique. En revanche, il est établi que la symptomatologie évolue avec l'âge (Tableau 1). Seules les manifestations cliniques les plus courantes seront traitées dans ce chapitre (Figure 10).

	0-10 ans	10-20 ans	20-35 ans	>35 ans
Voies aériennes	Obstruction précoceBronchectasies	BronchectasiesPansinusite	BronchectasiesHémoptysiesPneumothorax	Détresse respiratoireTransplantation
Infection(s) respiratoire(s) prédominante(s)	 S. aureus (méti-S) 	 <i>S. aureus</i> (méti-S et -R) <i>P. aeruginosa</i> (intermittent) ABPA 	 <i>P. aeruginosa</i> Autres Gram - 	-
Pancréas	 Insuffisance exocrine 	-	 Diabète sucré 	-
Foie	 Dysfonctionnement 	StéatoseFibrose biliaire	CirrhoseHypertension portale	Transplantation
Intestins	<i>Meconium ileus</i>Prolapsus rectal	-	 SODI 	-
Système reproducteur	AzoospermieMucus cervical épais	-	-	-
Autres	-	-	ArthroseOstéoporose	-

Tableau 1. Evolution des troubles liés à la mucoviscidose en fonction de l'âge des patients, d'après O'Sullivan et Freedman [47], Elborn [26] et Bellis et al. [9].

ABPA, Aspergillose broncho-pulmonaire allergique ; méti-S, méthicilline-sensible ; méti-R, méthicilline-résistant ; *P. aeruginosa*, *Pseudomonas aeruginosa* ; *S. aureus*, *Staphylococcus aureus* ; SODI, Syndrome d'occlusion distale de l'intestin



Figure 10. Principaux organes touchés par la mucoviscidose, d'après Paranjape et Mogayzel [48].

1.4.1. Atteinte du système respiratoire

Le principal organe impacté par la mucoviscidose est le poumon, dont la sévérité de l'atteinte conditionne le pronostic. Les enfants CF naissent avec des poumons fonctionnels, qui vont rapidement subir une inflammation démesurée en raison de l'afflux de polynucléaires neutrophiles, d'interleukine 8, et de diverses protéines pro-inflammatoires. L'état inflammatoire, causé par l'accumulation de mucus bronchique et exacerbé par l'installation de divers microorganismes, engendre la destruction progressive et irréversible du tissu pulmonaire déjà fragilisé par les phénomènes d'obstruction (Figure 9). Dans ce contexte, les bronchectasies (dialatation des bronches) et les hémoptysies sont fréquemment décrites. A un stade avancé d'insuffisance respiratoire, seule la transplantation pulmonaire offre une chance de survie [26,42].

Les infections respiratoires rencontrées au cours de la mucoviscidose seront abordées plus en détail dans le chapitre **1.7. Colonisation et infections respiratoires**.

1.4.2. Atteinte des glandes sudoripares

Longtemps désignée comme la maladie du « baiser salé », la mucoviscidose fut caractérisée dès sa découverte scientifique par une concentration anormalement élevée de chlorure de sodium dans la sueur des patients [15]. Cette particularité a été utilisée pour développer le « test à la sueur ». La concentration physiologique moyenne des ions chlorures chez l'enfant et l'adulte sain est inférieure à 60 mmol.L⁻¹ [49]. Cependant, 1 à 2 % des patients atteints de mucoviscidose présentent un taux de chlorures normal ou limite dans la sueur [50], c'est pourquoi le diagnostic de la mucoviscidose ne doit pas reposer uniquement sur ce test.

1.4.3. Atteinte du système digestif

L'atteinte digestive de la mucoviscidose est polymorphe, touchant le tube digestif proprement dit, mais également ses glandes annexes (pancréas, foie, voies biliaires). L'ensemble de ces altérations impacte l'état nutritionnel des patients.

Au niveau pancréatique, le dysfonctionnement CFTR donne lieu à un suc pauvre en eau et en bicarbonates, ce qui favorise la précipitation des sécrétions acineuses riches en protéines. Ces précipitations forment des obstacles ductulaires en amont desquels le pancréas s'atrophie et se fibrose. L'involution de la glande pancréatique est précoce, et parfois même anténatale [51]. L'insuffisance pancréatique exocrine devient symptomatique lorsque près de 98% de la fonction pancréatique a disparu [52], soit généralement dans les 2 premières années de vie. Plus de 80% de la population CF mondiale souffre d'insuffisance pancréatique exocrine, par ailleurs observée chez 99% des malades homozygotes pour la mutation Δ F508 [53–55]. D'un point de vue physiopathologique, le défaut de sécrétion en enzymes pancréatiques empêche la neutralisation du pH gastrique, qui reste très acide. Les enzymes pancréatiques dont l'activité s'exprime uniquement à pH alcalin, ne sont pas fonctionnelles. Ainsi, les glucides, protides et lipides ne sont pas digérés, entraînant un syndrome de malabsorption avec pour conséquences principales : (i) un déficit nutritionnel ; (ii) des douleurs abdominales ; et (iii) une stéatorrhée. Par ailleurs, la rétention d'enzymes au niveau du pancréas peut aboutir à un processus d'autodigestion exposant les patients à un risque de diabète sucré. L'existence d'un diabète a une valeur pronostique [56], justifiant un dépistage et un traitement précoce.

Au niveau hépatique, le défaut des canaux chlore présents à la surface des cholangiocytes est responsable de bouchons muqueux obstruant la lumière biliaire. Outre les phénomènes purement occlusifs, une cytotoxicité directe de la bile et des acides biliaires, de même que la stimulation de cytokines proinflammatoires et pro-fibrotiques, participerait au développement des lésions. L'atteinte hépatique est retrouvée chez environ 30% des patients [57]. Une sécrétion insuffisante d'enzymes hépatiques contribue au syndrôme de malabsorption des nutriments, dont les protides, les lipides, et les vitamines liposolubles A, D, E et K. L'évolution du tableau hépatique se fait inconstamment vers la cirrhose. Ce risque est de l'ordre de 5 à 10% avant l'âge de 10 ans [58,59]. L'hypertension portale et les varices oesophagiennes sont des complications fréquentes de la cirrhose. L'atteinte hépatique, associée ou non à la cirrhose, constitue la troisième cause de mortalité dans la mucoviscidose après l'atteinte respiratoire et les complications post-transplantation [57,60].

Au niveau intestinal, des sécrétions épaisses peuvent stopper la progression du bol fécal. Il est fréquent qu'une occlusion soit observée immédiatement après la naissance (*meconium ileus*) [25,47,61]. Les enfants

plus âgés et les adultes peuvent également souffrir de constipation et d'obstruction intestinale (*SODI : Syndrome d'occlusion distale de l'intestin*).

1.4.4. Atteinte du système reproducteur

L'infertilité chez la femme CF est un phénomène rare qui résulte d'un épaississement du mucus cervical faisant obstacle à la progression des spermatozoïdes au niveau endocervical [62]. *A contrario*, la quasi-totalité des hommes atteints de mucoviscidose sont infertiles. Il s'agit d'une azoospermie obstructive (*ACD : absence de canaux déférents*) qui ne les empêche pas de procréer, la spermatogenèse étant normale. Les hommes en désir de paternité peuvent ainsi recourir à la procréation médicalement assistée, qui nécessitera un prélèvement de sperme par microaspiration épididymaire (l'ACD empêchant le recueil des spermatozoïdes dans l'éjaculat). Parfois, l'ACD est la seule manifestation clinique sous laquelle s'exprime une mutation *CFTR*, y compris lorsqu'elle touche un seul allèle [63,64]. Du fait de son caractère héréditaire, l'identification de mutation(s) chez un sujet ACD implique de rechercher la présence d'une mutation du gène *CFTR* chez la conjointe afin qu'en cas de résultat positif, un diagnostic pré-implantatoire ou prénatal puisse être proposé au couple.

1.5. Diagnostic

Le diagnostic de mucoviscidose est suspecté devant la présence de signes cliniques évocateurs (iléus méconial, stéatorrhée, encombrement et/ou infections récurrentes des voies respiratoires). Il est également envisagé lorsqu'il existe un contexte familial (*e.g.* enfant atteint dans la fratrie, hétérozygotie parentale connue) ou si le dépistage néonatal est positif.

Depuis 2002, le dépistage néonatal systématique de la mucoviscidose a été étendu sur l'ensemble du territoire métropolitain ainsi qu'en France d'Outre-mer [65]. Cette stratégie permet de réduire les retards de diagnostic et ainsi améliorer le pronostic *via* une prise en charge précoce. Le protocole de dépistage à J3 repose sur le dosage sanguin d'une protéine, la trypsine immuno-réactive (TIR), combiné à la recherche des mutations *CFTR* les plus fréquentes (Figure 11). La TIR est plus abondante en cas de dysfonctionnement pancréatique durant la vie fœtale et les premiers mois de vie. Très sensible, son dosage permet de repérer environ 95% des nouveau-nés atteints de mucoviscidose ; en revanche, la spécificité insuffisante du dosage de la TIR (0.5-1% de faux positifs) justifie le couplage systématique avec l'analyse génétique. Cette dernière fait appel au kit Elucigene[®] CF30v2 ciblant 29 mutations (suite à la suppression de la R117H en 2015). Si l'analyse moléculaire n'est pas réalisée (absence ou refus de consentement parental), ou si aucune mutation n'est retrouvée malgré une valeur de la TIR très élevée à J3, un nouveau dosage de TIR sera réalisé à J21. Les enfants porteurs d'au moins une mutation identifiée par le kit CF30v2, ou présentant une TIR au-dessus du seuil à J21, seront convoqués dans un centre de ressources et de compétences de la mucoviscidose (CRCM) afin d'y réaliser un test à la sueur qui, sauf exception, confirmera ou infirmera le diagnostic.



Figure 11. Algorithme actuel pour le dépistage de la mucoviscidose en France, d'après Munck *et al.* [65]. CRDN, Centres Régionaux de Dépistage néonatal ; CFSPID, *Cystic fibrosis screened positive, inconclusive diagnosis.*

Cet algorithme de dépistage a fait l'objet de nombreuses critiques, en raison notamment des contraintes liées au test génétique, qu'elles soient organisationnelles (recueil du consentement écrit obligatoire) ou éthiques [dépistage de cas au diagnostic incertain (14%), dépistage d'hétérozygotes porteurs sains, kits inadaptés aux minorités ethniques]. Une réflexion a débuté suite à la découverte d'un marqueur biochimique de la mucoviscidose, le polypeptide d'activation pancréatique (PAP) [66]. L'objectif principal du dépistage néonatal étant de repérer les enfants CF qui bénéficieront d'une prise en charge précoce, la Haute Autorité de Santé (HAS) a préconisé l'abandon de l'analyse ADN au profit du dosage du PAP [67]. Cependant, la comparaison des algorithmes TIR/PAP *versus* TIR/ADN sur 553164 nouveau-nés en France a montré une valeur prédictive positive (VPP) trop faible pour le couple TIR/PAP, constituant un frein à son implémentation [66]. Actuellement, une combinaison TIR/PAP/ADN offrant une meilleure VPP avec une sensibilité acceptable tout en détectant moins de cas incertains et de porteurs sains par rapport au tandem TIR/ADN, est en cours d'étude pour déterminer les valeurs seuils de TIR et PAP dans ce cadre précis. Ce changement d'algorithme intégrant le PAP a été évalué par la Caisse Nationale d'Assurance Maladie et la Direction Générale de la Santé qui, sous réserve d'une évaluation économique favorable, proposent de le soumettre aux nouvelles instances du dépistage néonatal.

La mucoviscidose étant une maladie génétique héréditaire, elle est présente chez l'enfant lorsqu'il naît. Pourtant, certaines formes dites « modérées » ou « atypiques », relativement rares, se manifestent plus tardivement. Il s'agit de formes atténuées (et donc moins sévères) associées à des mutations n'altérant pas totalement la fonction de la protéine CFTR, et diagnostiquées parfois très tard dans l'âge adulte [68,69]. Ainsi, le moindre signe évoquant – ou faisant soupçonner – une atteinte organique compatible avec la mucoviscidose doit faire confirmer cette pathologie. Le diagnostic est habituellement évoqué par le pneumologue, qui devant un tableau alliant toux chronique, bronchectasies, et infections pulmonaires à répétition, fera réaliser un test à la sueur. Il apparaît qu'en cas de diagnostic tardif, la valeur de ce test est plus basse que lorsque le diagnostic est posé dans l'enfance [49,50,70] ; la négativité du test à la sueur ne permet donc pas d'éliminer totalement le diagnostic. De même, le kit utilisé pour le diagnostic néonatal, qui détecte uniquement les mutations les plus fréquentes sans présumer de l'origine ethnique, risque d'être ici faussement négatif, d'où l'intérêt d'une étude exhaustive du gène *CFTR*.

1.6. Avancées dans le traitement de la mucoviscidose

Bien qu'aucun traitement curatif ne permette encore aujourd'hui de guérir la mucoviscidose, des progrès considérables ont été réalisés dans la prise en charge des malades. Ces progrès ont contribué à l'amélioration de la qualité, mais aussi de l'espérance de vie des patients, dont la médiane dans les pays riches a augmenté de 6 ans par décennie depuis les années 1960 (Figure 12). Le traitement symptomatique est majoritairement axé sur la prise en charge de l'atteinte respiratoire, associant kinésithérapie, fluidifiants mucolytiques, anti-inflammatoires, bronchodilatateurs, et antibiothérapie agressive (surtout pendant les épisodes d'exacerbation). L'amélioration de l'état nutritionnel (compléments alimentaires, enzymes pancréatiques) revêt également un aspect important dans ce contexte. Néanmoins, ces thérapeutiques permettent seulement de ralentir la progression de la maladie, qui évoluera inexorablement vers une insuffisance respiratoire grave dont la transplantation bi-pulmonaire constitue le seul traitement alternatif.





HTS : dépistage néonatal systématique ; AZLI, aztréonam en solution pour inhalation ; TIP, tobramycine en solution pour inhalation

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez *Scedosporium apiospermum*, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose Grâce à une meilleure compréhension des mécanismes liés aux mutations du gène *CFTR* (voir §1.3.3. Les mutations du gène *CFTR*), les espoirs se tournent désormais vers des thérapies dites « étiologiques », qui s'intéressent directement aux origines génétiques de la maladie (Figure 13). On en distingue deux catégories (pour revue, Lebecque *et al.* [72], Lopes-Pacheco [73], Christopher Boyd *et al.* [74]) :

- Les thérapies pharmacologiques, qui agissent sur la protéine CFTR afin de normaliser l'efflux d'ions chlorures
- Les thérapies géniques, qui ciblent le gène *CFTR* en vue de corriger la mutation ou de synthétiser *de novo* une protéine CFTR non-mutée



Figure 13. Thérapeutiques innovantes dans la mucoviscidose.

(A) Représentation schématique de différentes approches possibles pour le traitement étiologique du dysfonctionnement CFTR. (B) Structure chimique des quatre modulateurs de CFTR disposant actuellement d'une AMM dans le cadre de la mucoviscidose. D'après Hughes et al. [75] et CNRS Le Journal (https://lejournal.cnrs.fr/).

1.6.1. Traitement pharmacologiques

Les techniques de criblage à haut débit ont permis d'identifier plusieurs composés d'intérêt thérapeutique dans la mucoviscidose. Il s'agit de petites molécules ayant pour objectif de corriger spécifiquement le dysfonctionnement du canal CFTR tout en considérant la classe de mutation en cause. Le développement de tels médicaments constitue un challenge important, notamment pour les mutations des classes I (absence de synthèse) et II (destruction prématurée et excessive avant l'adressage) qui sont associées à une absence totale ou quasi-totale de protéine CFTR au niveau membranaire.

a) Les modulateurs de l'activité du canal CFTR

La voie la plus avancée vers un traitement étiologique de la mucoviscidose est celle des « modulateurs ».

A l'origine, des expériences in vitro suggéraient que la restauration d'une activité CFTR à hauteur de 25% de la valeur normale suffirait à régénérer la fonction muco-ciliaire et ainsi éviter la détérioration des voies respiratoires [76]. En 2009, l'entreprise pharmaceutique Vertex développa le premier modulateur CFTR capable de répondre à cette exigence. Le VX-770 appelé Ivacaftor permettait en effet d'augmenter d'un facteur 10 la sécrétion d'ions chlorures par des cellules bronchiques humaines portant une mutation G551D (prototype des mutations « gating » de classe III) [77]. L'année suivante, un essai clinique rapportant l'efficacité spectaculaire de l'ivacaftor sur la fonction respiratoire des patients porteurs d'une mutation G551D validait cette approche [78]. L'ivacaftor est un modulateur qualifié de « potentiateur » : il améliore de façon sélective le transport des ions chlorures en augmentant le temps d'ouverture du canal CFTR ayant préalablement atteint sa localisation apicale. En cas de mutation G551D, il est estimé que l'ivacaftor permet un fonctionnement du canal chlore à 35–40% de la normale [79]. Depuis sa commercialisation en 2012, l'efficacité de l'ivacaftor (Kalydeco[®]) a été démontrée sur d'autres génotypes [80] et une extension de l'autorisation de mise sur le marché a été obtenue pour les patients porteurs de huit autres mutations de classe III. Cependant, compte tenu de son mécanisme d'action, l'efficacité de l'ivacaftor est très limitée pour les mutations de classe II, en particulier la délétion Δ F508. C'est pourquoi on y associe un composé dit « correcteur », tel que le VX-809/Lumacaftor, le VX-661/Tezacaftor ou encore le VX-445/Elexacaftor. Les correcteurs sont des molécules chaperonnes capables de quider la protéine jusqu'à son insertion dans la membrane, limitant ainsi sa dégradation par le protéasome. Malgré tout, les bénéfices cliniques de l'association ivacaftor-lumacaftor (Orkambi[®]) chez les patients homozygotes pour la mutation \triangle F508 sont plus modérés que ceux obtenus avec l'ivacaftor seul chez les patients porteurs d'une mutation G551D (Figure 14). Récemment, plusieurs études cliniques ont été menées afin de sélectionner une combinaison de 3 modulateurs permettant d'améliorer davantage le niveau de correction du canal CFTR au sein de la population △F508 (soit environ 90% des sujets). A ce titre, la trithérapie ivacaftor-tezacaftor-elexacaftor s'est avérée la plus efficace en offrant une nette amélioration des fonctions respiratoires comparativement au placebo et à la bithérapie ivacaftor-tezacaftor (Symkevi[®]), et ce, aussi bien chez les patients homozygotes pour la mutation Δ F508 que chez les patients porteurs d'une copie Δ F508 associée à une mutation à fonction minimale (classes I et II) (Figure 14). Ce dernier point signifie qu'à terme, tous les patients porteurs d'au moins une copie de la mutation △F508 seraient concernés ; on peut d'ailleurs escompter que le bénéfice de ces trithérapies sera supérieur si la seconde mutation appartient aux classes IV et V (mutations à fonction résiduelle), et plus encore s'il s'agit d'une mutation de classe III. C'est dans ce contexte que la trithérapie (Trikafta[®]) a obtenu, dès octobre 2019, l'autorisation de mise sur le marché américain avec une indication étendue à tous les profils génétiques hétérozygotes pour la mutation Δ F508.





Figure 14. Amélioration moyenne du VEMS en valeur absolue (VA) sous modulateurs.

Sous le graphique sont précisés les molécules testées, le nom de la spécialité, les génotypes ciblés, l'âge des patients inclus, et l'année de publication des résultats. Les études s'intéressant à des génotypes similaires sont représentées de la même couleur. I, ivacaftor ; L, lumacaftor ; T, tezacaftor ; E, elexacaftor ; VX-659, correcteur du CFTR abandonné compte tenu d'une efficacité et d'une tolérance relativement moindres comparé à l'elexacaftor. Adapté de Lebecque et al. [72].

Si les résultats cliniques concernant les modulateurs CFTR et en particulier la trithérapie ont suscité beaucoup d'espoir au sein de la communauté médicale, il convient de rester prudent sur leurs effets à long terme. En effet, bien que l'expérience avec l'ivacaftor suggère que la prévalence de certaines complications puisse décroître (*e.g.* bronchectasies), celles-ci ne disparaîtront pas, tout comme les lésions irréparables d'organes autres que le poumon, comme une cirrhose ou un diabète induit. Par ailleurs, certains génotypes ne sont pas couverts par cette trithérapie, tels que les homozygoties de classe I, et probablement aussi certaines mutations de classe II présentes à l'état homozygote, soit environ 10% de la population mucoviscidosique. Enfin, ces thérapies innovantes (comme tout traitement pharmacologique) doivent être administrées régulièrement, et aucune d'entre elles ne permet une quérison permanente.

b) Les suppresseurs de codons-stop

Les mutations de classe I (non-sens) entraînent un arrêt prématuré de la traduction. Il en résulte une absence totale de protéine CFTR au niveau membranaire, ce qui rend ces mutations inaccessibles aux traitements modulateurs. Pour contourner ce problème, des molécules de translecture ont été développées : le PTC-124 ou Ataluren (Translarna[®]) de l'entreprise PTC Thérapeutics permet au ribosome de passer outre les codons-stop prématurés (mais pas les codons stop naturels) et autoriser ainsi la synthèse de la protéine CFTR dans sa totalité [81]. Cette molécule est déjà utilisée pour le traitement de la myopathie de Duchenne. Dans la mucoviscidose, les études cliniques de phase II ont montré que l'ataluren permettait d'améliorer le transport du chlore au niveau nasal [82,83] ; néanmoins, aucun bénéfice n'a pu être observé sur les fonctions pulmonaires dans les études de phase III [84,85] et le développement de la molécule a donc été abandonné dans ce cadre. Les enjeux des travaux portant sur la correction des codons-stop sont considérables puisque les porteurs de ce type de mutation (dont l'atteinte est sévère) ne bénéficient encore d'aucun traitement spécifique.

1.6.2. Thérapie génique

La thérapie génique est un procédé qui consiste soit à introduire du matériel génétique (ADN ou ARN) au sein de cellules spécifiques dans l'organisme, soit à réparer le gène défectueux présent dans ces cellules ('gene editing'). Dans les deux cas, l'objectif est que les cellules traitées par thérapie génique puissent à nouveau synthétiser une protéine fonctionnelle.

La thérapie génique a nourri de nombreux espoirs dès la découverte du gène responsable de la mucoviscidose en 1989. En effet, la maladie étant monogénique, elle constituait un excellent candidat pour la thérapie génique. Avec l'avènement des techniques de biologie moléculaire, les chercheurs se sont rapidement attelés à reproduire in vitro le gène CFTR sauvage dans l'optique de corriger l'anomalie causale. Cet enthousiasme initial a cependant été tempéré par des difficultés rencontrées lors des tentatives de réintroduction du gène CFTR dans les cellules épithéliales pulmonaire, puisqu'aucun vecteur (notamment viral) n'était optimisé pour permettre cette action [86]. En 2015, le Consortium britannique de thérapie génique a étudié une approche innovante visant à introduire, dans les cellules pulmonaires, des copies correctes du gène CFTR conditionnées sous forme de liposomes à inhaler une fois par mois [87]. Une augmentation de la fonction respiratoire, certes légère (augmentation de 3,7% du VEMS) mais significative, a été relevée chez les patients du groupe thérapie génique comparé au groupe placebo. Cette augmentation atteignait même 6,4% chez les patients ayant la fonction respiratoire la plus dégradée, prouvant ainsi que la thérapie génique 'classique' (i.e. l'insertion d'une copie fonctionnelle du gène dans le génome atteint) restait une approche prometteuse. Actuellement, le Consortium travaille sur l'optimisation du transfert génique, avec la mise au point d'une stratégie virale basée sur l'utilisation d'un lentivirus modifié de telle sorte qu'il pénètre spécifiquement les cellules pulmonaires. Sur modèle murin, des chercheurs ont montré qu'une seule administration du virus apportant le gène CFTR était suffisante pour que la protéine CFTR soit produite pendant toute la durée de vie de l'animal (deux ans). Ainsi, contrairement aux liposomes, une administration mensuelle ne serait pas nécessaire. Ces données encourageantes devraient permettre l'évaluation de la stratégie lentivirale chez l'homme dans un futur proche [88].
En thérapie génique, une autre option consiste à apporter, directement aux cellules, l'ARN messager (ARNm) codant pour la protéine fonctionnelle. L'avantage de cette approche est que l'ARNm n'a pas besoin d'atteindre le noyau de la cellule (l'information véhiculée par l'ARNm étant décodée dans le cytoplasme par les ribosomes), ce qui constitue un obstacle de moins à franchir comparativement à la thérapie génique classique. Une étude de phase 1/2 est actuellement en cours avec le MRT5005 (essai clinique NCT03375047), qui est de l'ARNm conditionné dans des nanoparticules optimisées pour la délivrance pulmonaire. Les résultats de cet essai clinique, qui prévoit l'inclusion de 40 adultes porteurs de deux mutations de classe I et/ou de classe II, sont attendus au second semestre 2021.

Enfin, la possibilité de réparer le gène *CFTR* muté ('gene editing') est également à l'étude, mais il est encore trop tôt pour envisager son utilisation chez l'homme. En effet, bien que la technologie envisagée (CRISPR-Cas9) ait récemment prouvé son potentiel pour la correction des mutations *CFTR* [74], celle-ci n'est pas sans risque. CRISPR-Cas9 est un complexe chargé de reconnaître et d'exciser très précisément l'ADN déficient avant d'en restaurer la séquence correcte ; une ouverture de l'ADN au mauvais endroit (effet « hors-cible ») reste néanmoins possible, exposant ainsi la cellule à l'introduction de nouvelles mutations potentiellement oncogènes. L'objectif aujourd'hui est d'améliorer la spécificité du système CRISPR-Cas9 [89] et le pourcentage de correction atteignable.

1.6.3. Conclusion

Les avancées thérapeutiques récentes dans le domaine de la mucoviscidose sont considérables, même si elles n'atteignent pas encore les objectifs finaux espérés. Actuellement, les traitements pharmacologiques semblent être les plus aboutis. En particulier, la trithérapie associant un potentiateur et deux correcteurs du canal CFTR (Trikafta[®]) a démontré des effets spectaculaires chez les patients Δ F508 homozygotes ou hétérozygotes. A l'avenir, les modulateurs pourraient être combinés à d'autres agents pharmacologiques dans l'optique d'une prise en charge plus adaptée à la diversité des mutations du gène *CFTR*. Les systèmes d'édition et de réintroduction du gène *CFTR* sont quant à eux très prometteurs dans l'objectif de corriger la maladie de façon durable. Toutefois, il est encore nécessaire d'optimiser la vectorisation du matériel génétique ainsi que le rendement et la spécificité de ces technologies qui requièrent une précision parfaite pour ne pas causer de mutations secondaires inattendues. En outre, les thérapies géniques et la modification du génome posent des questions éthiques, en particulier lorsque le matériel génétique correspondant est introduit *via* des particules virales.

1.7. Colonisation et infections respiratoires

L'infection broncho-pulmonaire représente le problème majeur auquel sont confrontés les patients atteints de mucoviscidose. Le dysfonctionnement CFTR entraîne la production d'un mucus épais et visqueux, propice à l'installation de divers microorganismes. Ces derniers s'y retrouvent piégés. L'altération des fonctions muco-ciliaires ne permettant plus l'élimination des pathogènes inhalés, les voies respiratoires se retrouvent progressivement colonisées. La récurrence des épisodes infectieux, avec passage à la chronicité sur des périodes de plusieurs mois/années, contribue fortement à l'inflammation et à la dégradation irréversible de l'épithélium bronchique, participant ainsi au déclin des fonctions respiratoires et donc au mauvais pronostic de la mucoviscidose.

1.7.1. Infections virales

Les virus ont été relativement peu étudiés dans la mucoviscidose. Les enfants CF peuvent néanmoins contracter des infections virales dès leur plus jeune âge. La nature des agents impliqués (majoritairement, le virus respiratoire syncytial (VRS), les rhinovirus, les virus influenza A et B), leur fréquence et leur saisonnalité sont équivalentes aux infections virales développées par des individus sains ; en revanche le contexte mucoviscidosique semble associé à des infections virales plus sévères avec une convalescence plus longue [90,91]. Le VRS et les virus influenza sont notamment connus pour être associés aux épisodes d'exacerbation aiguë [92,93]. Des données récentes suggèrent même l'implication des infections virales précoces dans l'initiation des phénomènes inflammatoires au niveau du tractus respiratoire [94]. En outre, les virus favoriseraient la colonisation respiratoire bactérienne et l'action pro-inflammatoire des bactéries, indiquant leur rôle potentiel dans la pathogenèse de la mucoviscidose [95,96].

1.7.2. Infections bactériennes

a) Agents en cause dans ces infections

Les bactéries représentent la classe d'agents infectieux la plus largement étudiée dans le contexte de mucoviscidose. Très tôt dans l'enfance, les voies respiratoires des patients CF subissent les assauts de deux bactéries : *Staphylococcus aureus* (isolats initialement sensibles à la méthicilline) et *Haemophilus influenzae*, qui sont des germes fréquemment rencontrés en pathologie humaine. Dans le contexte mucoviscidosique, ces infections provoquent l'apparition de bronchectasies (dilatation des bronches) qui constituent un terrain favorable pour l'installation de diverses bactéries à Gram-négatif. Il s'agit de pathogènes opportunistes au premier rang desquels figure *Pseudomonas aeruginosa*, suivi de *Stenotrophomonas maltophilia* et *Achromobacter (Alcaligenes) xylosoxidans*. De par leur résistance naturelle à certains antibiotiques, mais également leur capacité à acquérir des résistances secondaires vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques, ces microorganismes requièrent l'utilisation d'une antibiothérapie agressive, le plus souvent administrée par voie intraveineuse. Alors que la prévalence des infections dues au complexe *Burkholderia cepacia* diminue, en particulier grâce au contrôle de la transmission inter-patients, celle des mycobactéries non-tuberculeuses (complexes *Mycobacterium abscessus* et *Mycobacterium avium*) augmente. Ce sont des agents très pathogènes, spontanément multi-résistants et difficiles à traiter [26,97].

Par ailleurs, les bactéries sont capables de coloniser de façon chronique les voies respiratoires des patients CF. D'après le Registre Européen de Mucoviscidose 2017, la colonisation chronique est fréquente mais variable d'un pays à l'autre, allant de 14,3% à 62,2% pour *P. aeruginosa* et de 15,5% à 84,4% pour *S. aureus* (tous âges confondus) [23]. Il ne faut pas oublier que le microbiote pulmonaire est indéniablement polymicrobien, mais sa description et sa compréhension sont longtemps restées cantonnées à la bactériologie conventionnelle (*i.e.* culture des prélèvements). Des études récentes basées sur l'utilisation des techniques de séquençage nouvelle-génération (NGS) ont permis d'identifier un large éventail de bactéries dans les poumons mucoviscidosiques, incluant notamment des anaérobies strictes. Le rôle de ces dernières n'est pas clairement établi, la plupart pouvant aussi être détectées chez des individus sains ; en revanche, plusieurs études suggèrent qu'une diminution de la diversité du microbiote pulmonaire chez les patients CF est associée à une fonction respiratoire moins bonne, en particulier lorsque celle-ci survient au détriment des bactéries anaérobies [26,98,99]. Ces données soulèvent d'importantes questions quant à l'utilisation des antibiotiques dans la mucoviscidose et pourraient expliquer pourquoi une surreprésentation de *P. aeruginosa* est parfois rapportée dans les cohortes de patients nouvellement diagnostiqués sous prophylaxie antibiotique.

b) Situation en France

Les données colligées dans le Registre Français de la Mucoviscidose 2017 indiquent que 76,3% des patients présentent une flore respiratoire anormale [9]. Il s'avère que *S. aureus* (majoritairement méthicillinesensible ; *S. aureus* méti-S ou SASM) et *P. aeruginosa* sont les principales espèces responsables d'infections bactériennes tout au long de la vie des patients. Leur prévalence respective dans la population mucoviscidosique totale est de 61,6% et 36,8%. A noter que la fréquence des isolements de *S. aureus* se stabilise depuis quelques années, alors que celle de *P. aeruginosa* diminue graduellement.

Par ailleurs, il est important de souligner que la nature et la fréquence des agents isolés varient en fonction de l'âge des patients (Figure 15). Ainsi, de 0 à 24 ans environ les SASMs prédominent, et ce, malgré une diminution progressive dès l'âge de 15 ans. A partir de 25 ans, ce sont les infections à *P. aeruginosa* qui s'imposent. En outre, parmi les enfants de moins de 10 ans, plus d'un quart souffrent d'infections dues à *H. influenzae*, ce qui les placent au second rang après les infections à SASMs mais devant les infections à *P. aeruginosa*. Enfin, la fréquence des infections causées par les espèces du complexe *B. cepacia*, les SARMs (*S. aureus* méthicilline-résistants ou méti-R), *A. xylosoxidans* et *S. maltophilia* n'excède pas 15% et s'avère relativement stable tout au long de la vie des patients.



Figure 15. Répartition des principaux germes respiratoires isolés dans le contexte de mucoviscidose en France, adapté de Bellis *et al.* [9].

1.7.3. Colonisation et infections fongiques

Pendant longtemps, l'attention est restée focalisée sur les infections bactériennes qui dominent le tableau infectieux dans le contexte de mucoviscidose, et ce dès le plus jeune âge. Avec l'allongement de la durée de vie des patients, un certain nombre de champignons ont pourtant été isolés (de façon transitoire ou chronique) à partir des sécrétions respiratoires de patients CF, et leur implication dans la pathogénie de la mucoviscidose n'a été étudiée que relativement récemment.

De façon similaire aux bactéries, l'altération du tapis muco-ciliaire empêche l'élimination des spores inhalées qui se trouvent ainsi piégées dans l'épaisseur du mucus bronchique. Les traitements antibiotiques utilisés pour traiter les infections/colonisations bactériennes favoriseraient l'installation des champignons en fragilisant l'épithélium bronchique. L'utilisation de corticoïdes inhalés visant à limiter l'inflammation chronique semble aussi jouer un rôle dans l'implantation et le développement des espèces fongiques [100,101]. Les infections fongiques sont donc fréquemment associées aux infections bactériennes et/ou virales.

Il n'y a actuellement aucune standardisation en ce qui concerne la démarche diagnostique des infections/colonisation respiratoires d'origine fongique. Ainsi, les résultats sont difficilement comparables d'une étude à l'autre [102,103]. Standardiser l'isolement mais aussi l'identification des espèces fongiques, en particulier *via* l'utilisation de milieux de culture conventionnels et semi-sélectifs, permettrait de mieux appréhender l'épidémiologie de ces infections. En France, le Référentiel en microbiologie médicale (Rémic) a

récemment évolué dans ce sens en intégrant les recommandations issues de l'étude multicentrique Mucofong [103], ce qui constitue un premier pas vers l'harmonisation des pratiques à l'échelon national.

Quelques généralités ont pourtant émergé. Chez le patient non-greffé, les auteurs s'accordent à dire que certaines espèces seront uniquement responsables d'une colonisation asymptomatique tandis que d'autres exprimeront leur pathogénicité et seront à l'origine d'authentiques infections ou de réactions immunoallergiques contribuant à la détérioration des fonctions respiratoires (Figure 16) [92,104]. Chez le patient greffé, ces agents peuvent être responsables d'infections invasives ou disséminées potentiellement mortelles.



Figure 16. Biodiversité fongique dans la mucoviscidose, adapté de Chmiel et al. [105].

Les champignons sont regroupés ici en fonction de leur fréquence d'isolement (abscisses) et de leur pathogénicité établie (ordonnées). Ces agents sont encore divisés selon leur chronicité. Genres à faible chronicité : *A.* = *Aspergillus*; *E.* = *Exophiala*; *P.* = *Pneumocystis*; *R.* = *Rasamsonia*. Genres à chronicité élevée : *A.* = *Aspergillus* (*flavus, nidulans, niger, terreus*); *A.* = *Acrophialophora* (*fusispora*); *B.* = *Blastobotrys*; *C.* = *Candida*; *E.* = *Exophiala*; *N.* = *Neosartorya*; *L.* = *Lomentospora*; *S.* = *Scedosporium*; *T.* = *Trichosporon*.

a) Levures

Candida spp.

Les levures du genre *Candida*, en particulier *C. albicans*, sont les plus fréquemment isolées d'expectorations provenant de patients mucoviscidosiques. Plusieurs études rapportent des prévalences élevées, intéressant jusqu'à 60%, voire même 80%, des patients inclus [95,104,106]. La détection de *C. albicans* est d'interprétation difficile puisqu'il s'agit d'une espèce commensale de la flore oro-pharyngée. Aussi, *C. albicans* est-il souvent perçu comme un « simple » colonisateur chez le patient non greffé [104]. Une étude austro-allemande s'intéressant à 770 adolescents CF n'a pas montré d'association négative entre la colonisation à *C. albicans* et la fonction respiratoire [107]. A l'inverse, dans leur étude, Chotirmall *et al.* [108] suggéraient que la colonisation respiratoire chronique par *C. albicans* était associée à une évolution péjorative (baisse accélérée du VEMS et exacerbations nécessitant une hospitalisation). Une autre étude longitudinale prospective conforte ces résultats : en effet, les patients colonisés chroniquement par *C. albicans* présentaient

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez *Scedosporium apiospermum*, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose © 33 un VEMS à l'inclusion significativement plus faible et qui déclinait plus rapidement que les patients non-colonisés [109]. Cependant, aucune de ces 2 études n'a contrôlé la contamination éventuelle des crachats par des levures naturellement présentes dans la cavité orale ; il est donc impossible de déterminer si *C. albicans* constituait un simple « spectateur » ou s'il exprimait un pouvoir pathogène contribuant individuellement à la progression de la maladie.

D'autres espèces du genre *Candida* telles que *C. dubliniensis* (espèce « sœur » de *C. albicans*), *C. glabrata, C. tropicalis* et *C. parapsilosis* sont également isolées dans le contexte de mucoviscidose, mais dans des proportions moindres. Peu d'informations sont disponibles concernant leur impact potentiel sur les fonctions respiratoires des patients CF. Concernant *C. glabrata*, l'étude longitudinale d'Hector *et al.* [107] rapportait un déclin plus rapide du VEMS chez les patients colonisés par cette levure comparés à ceux qui ne l'étaient pas. Ces résultats doivent néanmoins être interprétés avec précaution compte tenu de la faible occurrence de *C. glabrata* dans la cohorte étudiée (4,6%). Deux études ayant investigué la prévalence de *C. dubliniensis* dans la mucoviscidose ont, quant à elles, montré que tous les patients (adultes et enfants) colonisés par cette levure étaient cliniquement stables pendant toute la durée du suivi [110,111]. Le rôle de *Candida* spp. dans la pathogénie de la mucoviscidose reste donc controversé.

Trichosporon mycotoxinivorans

Cette levure arthrosporée est considérée comme un pathogène associé à la mucoviscidose depuis 2009 [112]. A ce jour, une dizaine de cas ont été documentés dans ce contexte précis (intervalle d'âge : 8-37 ans) [113]. Il s'agit essentiellement d'infections pulmonaires ou disséminées, habituellement fatales malgré l'utilisation d'antifongiques systémiques. Un cas de colonisation chronique sans répercussion clinique apparente a également été décrit [114]. D'après Esther *et al.* [115], les patients mucoviscidosiques avec isolement de *T. mycotoxinivorans* à partir des expectorations présenteraient une dégradation plus importante des fonctions respiratoires au fil du temps. A l'inverse, l'introduction d'un traitement antifongique dirigé contre ce pathogène permettait une augmentation significative du VEMS. Les mécanismes qui sous-tendent la relation entre *T. mycotoxinivorans* et mucoviscidose n'ont pas été investigués, même si une étude a montré la capacité de ce champignon à produire du biofilm [113].

Blastobotrys spp.

L'avènement des techniques de biologie moléculaire a permis de mettre en lumière d'autres levures qui n'avaient jamais décrites auparavant en position pathogène. C'est le cas des *Blastobotrys*, dont deux espèces se sont récemment avérées délétères chez le patient mucoviscidosique : *B. adeninivorans* et *B. raffinosifermentans*. En effet, dans les 4 cas rapportés dans la littérature qui ont tous nécessité le recours au séquençage des régions ITS (internal transcribed spacer) des ADN ribosomaux (ADNr), ces levures étaient systématiquement associées à des épisodes d'exacerbation aiguë, dont un s'est compliqué d'une fongémie [116–118]. Dans l'un de ces cas, la présence récurrente de *Blastobotrys* sp. était documentée chez un jeune enfant en attente de transplantation pulmonaire. L'examen anatomo-pathologique de l'explant, combiné à l'absence de *P. aeruginosa* (pourtant retrouvé de façon chronique en pré-greffe) et surtout l'isolement de *Blastobotrys raffinosifermentans* en culture pure, suggéraient fortement l'imputabilité de ce microorganisme

dans la détérioration clinique observée au cours des mois précédant la greffe [117]. Les *Blastobotrys*, tout comme *Trichosporon mycotoxinivorans*, sont des agents très peu sensibles aux antifongiques actuels ce qui pose la question de leur prise en charge thérapeutique, notamment en période pré- et post-transplantation.

b) Champignons filamenteux

Aspergillus spp.

Les *Aspergillus* sont des moisissures omniprésentes dans l'environnement extérieur (air, sols, végétaux...), mais aussi à l'intérieur de locaux comme les habitations ou les services hospitaliers dans lesquels ils peuvent trouver des conditions propices à leur développement (chaleur, humidité et manque d'aération). Ces champignons produisent des millions de spores de petite taille (diamètre <5 µm) qui sont véhiculées dans l'air puis inhalées. Chez la majorité des individus, les défenses naturelles suffisent pour les éliminer. En revanche, chez le patient CF, les anomalies du tapis muco-ciliaire empêchent l'évacuation de ces spores qui s'adaptent facilement à ce nouvel environnement.

Ainsi, les espèces du genre *Aspergillus* sont les principaux pathogènes fongiques associés à la mucoviscidose. Leur prévalence est très variable d'une étude à l'autre. Elle peut atteindre jusqu'à 78% de la population étudiée [119]. *Aspergillus fumigatus* en est le représentant le plus fréquent : avec une prévalence globale de 60%, *A. fumigatus* trône au premier rang des champignons filamenteux responsables de colonisation chronique des voies respiratoires dans la mucoviscidose, toutes études confondues [120]. Ce pathogène est cependant rarement isolé chez le jeune enfant ; sa fréquence augmente à partir de l'adolescence sans pour autant dépasser celle de *S. aureus* ou de *P. aeruginosa* (Figure 15) [9].

D'autres espèces appartenant au genre *Aspergillus* sont également rapportées dans le contexte de mucoviscidose, mais leur isolement est plus rare. C'est le cas pour *A. flavus*, *A. niger* et *A. nidulans*, dont la fréquence respective dépasse rarement les 5% [121,122]. Ces 3 espèces sont le plus souvent à l'origine d'un portage transitoire [100]. Inversement, *A. terreus* dont la fréquence d'isolement varie de 2% à 8% est souvent notifié de façon récurrente, ce qui en fait la troisième espèce fongique filamenteuse responsable de colonisation chronique.

De façon intéressante, les investigations moléculaires menées sur *A. fumigatus* et *A. terreus* ont permis de décrire différents profils de colonisation, allant du portage transitoire (ou intermittent) aux colonisations chroniques dues à un seul génotype ou à plusieurs génotypes retrouvés de façon consécutive ou simultanée [123–125]. Le suivi longitudinal des patients suggère que la diversité génotypique observée dans les colonisations récentes (< 1 an) diminue au cours de leur évolution, aboutissant à la sélection d'un petit nombre de génotypes [126]. En outre, les colonisations mixtes (\geq 2 espèces) représentent jusqu'à 33% des colonisations aspergillaires [127].

Plusieurs études ont rapporté une association négative entre le caractère chronique de la colonisation des voies respiratoires par les *Aspergillus* et la fonction respiratoire chez les patients mucoviscidosiques [128,129]. La population colonisée est aussi exposée à un risque plus important d'exacerbation pulmonaire. Par ailleurs, l'éventail des affections aspergillaires est très diversifié dans le contexte CF et dépasse largement le simple cadre de la colonisation. Ainsi, *Aspergillus fumigatus* peut être à l'origine d'aspergillomes, de bronchite,

d'asthme, mais également de réactions d'hypersensibilité dont l'archétype est l'aspergillose broncho-pulmonaire allergique (ABPA) [100,130]. L'ABPA est un facteur d'aggravation de la maladie : en l'absence de prise en charge, l'ABPA engendre des bronchectasies, une fibrose pulmonaire, et au final, une détresse respiratoire. Selon les études, sa prévalence varie entre 3 et 25% [131]. Dans une méta-analyse, Maturu et Agarwal [132] indiquent qu'environ 9% des enfants et 10% des adultes atteints de mucoviscidose développent une ABPA. Si *A. fumigatus* en est l'agent majoritaire, des cas d'ABPA sont également attribués à *A. terreus* [100,133]. Enfin, les espèces du genre *Aspergillus* peuvent causer des infections invasives, voire disséminées, en particulier après transplantation [134,135]. Leur prise en charge s'est complexifiée dernièrement avec l'émergence de résistances aux antifongiques azolés, notamment à la suite de traitements prolongés ou en lien avec la commercialisation depuis quelques années de certains fongicides triazolés pour l'agriculture [136–141].

Scedosporium spp.

Avec une prévalence comprise entre 3% et 17%, le genre *Scedosporium* constitue le deuxième genre de champignons filamenteux le plus souvent isolé des sécrétions respiratoires des patients atteints de mucoviscidose [104]. Dans ce contexte, la fréquence d'isolement des *Scedosporium* est de 8,6% en France, 10-12% en Australie, et jusqu'à 14% en Allemagne [95,142]. L'impact d'une colonisation à *Scedosporium* spp. est peu documenté et les patients sont en général asymptomatiques [142,143]. Cependant, compte tenu des similarités avec les enzymes sécrétées par les champignons du genre *Aspergillus*, en particulier la présence de protéases et de superoxyde dismutases [144–146], on peut suspecter l'implication des *Scedosporium* dans la réponse inflammatoire. A ce titre, les *Scedosporium* peuvent occasionner une forme immuno-allergique semblable à l'ABPA, appelée MBPA (mycose bronchopulmonaire allergique) [100,104]. Par ailleurs, ce sont des agents redoutables en cas de transplantation [2].

Les infections dues aux espèces du genre *Scedosporium* seront traitées plus en détail dans la partie suivante (voir §2. *Scedosporium* et mucoviscidose).

Lomentospora prolificans

Lomentospora prolificans est un champignon filamenteux qui a longtemps été classé parmi les Scedosporium. Récemment, les études de phylogénie moléculaire ont abouti à son reclassement dans un autre genre, Lomentospora. L'analyse des cas publiés jusqu'en 2009 montrait que l'isolement de *L. prolificans* était associé dans près de 12% des cas à la mucoviscidose [147]. Une colonisation respiratoire chronique, pouvant aller jusqu'à 4 ans, est également rapportée dans ce contexte [148,149]. Contrairement aux moisissures du genre Scedosporium, aucun cas de MBPA n'a été décrit avec *L. prolificans* [150]. En revanche, le pronostic est sombre en cas d'infection invasive ou disséminée.

Complexe d'espèces Rasamsonia argillacea

Connu jusqu'en 2011 sous le nom de *Geosmithia argillacea*, mais initialement décrit comme une espèce du genre *Penicillium (P. emersonii)*, *Rasamsonia argillacea* est aujourd'hui considéré comme un complexe de quatre espèces génétiquement distinctes, dont trois ont la capacité de coloniser le poumon mucoviscidosique : *R. argillacea sensu stricto*, *R. aegroticola* et *R. piperina* [151–157]. Ces champignons ont été décrits pour la première fois chez l'homme en 1999 [151]. Depuis, le nombre de cas de colonisation/infection par ces

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez *Scedosporium apiospermum*, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose champignons n'a cessé d'augmenter, aussi bien dans le contexte de la mucoviscidose [119,152–155,158–161] que de la granulomatose septique chronique [162–167]. En Europe, leur prévalence varie de 0,4% à 2,3% chez le patient mucoviscidosique [168]. Néanmoins, leur fréquence d'isolement est probablement sous-estimée puisque leurs caractéristiques microscopiques sont proches de celles des *Penicillium* et *Paecilomyces*. De nombreux cas d'identification erronée ont ainsi été relatés [157,161,163,167]. Les espèces les plus fréquemment rencontrées en pathologie humaine sont *R. argillacea sensu stricto* et *R. aegroticola* [153]. Parmi les antifongiques disponibles, seules les échinocandines sont constamment efficaces sur *Rasamsonia* spp. En effet, ces champignons sont intrinsèquement résistants au voriconazole et ils présentent une sensibilité variable à l'amphotéricine B, à l'itraconazole et au posaconazole [157,161]. Ce profil de résistance naturelle se distingue nettement de celui des *Paecilomyces* (avec lesquels ils sont souvent confondus), soulignant l'intérêt d'une identification correcte. L'introduction d'un traitement inadapté pourrait s'avérer problématique chez les patients greffés. Récemment, un cas d'infection disséminée à l'issue fatale a été documenté au décours d'une transplantation pulmonaire [161].

Exophiala dermatitidis

Exophiala dermatitidis est un champignon dématié (phaeohyphomycète) qui se présente sous forme de levures à 37°C, mais sous forme filamenteuse à 20-25°C : on parle de champignon dimorphique. Ce pathogène a été décrit pour la première fois dans la mucoviscidose en 1990 [169]. Dans ce contexte, *E. dermatitidis* est responsable d'une colonisation des voies aériennes, mais il peut aussi engendrer d'authentiques infections pulmonaires [68]. La colonisation intervient généralement assez tardivement dans l'évolution de la maladie : dans une étude hollandaise s'intéressant à 31 patients colonisés par ce champignon, l'âge moyen était de 28 ans (intervalle : 10-59) [143]. L'isolement répété d'*E. dermatitidis* à partir des sécrétions respiratoires a même permis d'évoquer une forme modérée de mucoviscidose qui fut par la suite confirmée chez deux femmes âgées respectivement de 68 et 87 ans [68].

La prévalence d'*E. dermatitidis* est extrêmement variable d'un pays à l'autre : 0,3% en Italie, 2% en France et en Espagne, 6% en Belgique et aux Pays-Bas, 7% en Autriche, 17% en Allemagne, et jusqu'à 19% en Suède [168,170–172]. Cette variabilité pourrait s'expliquer par des habitudes de vie différentes ; par exemple l'utilisation de lave-vaisselle ou encore la fréquentation de saunas/hammams, puisque le champignon affectionne particulièrement les endroits non ventilés où règnent chaleur et humidité [173–176]. Par ailleurs, l'absence de standardisation de l'examen mycologique des crachats induit probablement un biais dans les fréquences rapportées pour ce champignon, puisque la détection d'*E. dermatitidis* requiert une incubation longue (parfois jusqu'à 4 semaines). Afin de faciliter l'isolement de ce champignon, Horré *et al.* [177] ont proposé un milieu sélectif à base d'érythritol. Malgré l'utilisation de ce milieu de culture, la prévalence d'*E. dermatitidis* reste globalement faible en France [103].

Acrophialophora fusispora

Hyphomycète hyalin très rarement rencontré en pathologie humaine, *Acrophialophora fusispora* n'en demeure pas moins méconnu, y compris parmi les mycologues. Quelques cas de portage transitoire (3 patients) ou de colonisation chronique (2 patients) ont été documentés dans le contexte de mucoviscidose [178,179].

Néanmoins, comme pour les *Rasamsonia* spp., il est possible que sa fréquence soit sous-estimée en raison de confusion avec d'autres moisissures possédant des caractéristiques morphologiques proches, tels que *Scopulariopsis chartarum*, *L. prolificans*, ou encore certaines espèces du genre *Paecilomyces* [100].

1.7.4. Conclusion

La mucoviscidose est une pathologie multi-organes dont le pronostic dépend essentiellement de l'atteinte pulmonaire. Les infections à répétition, d'origine virale et/ou bactérienne d'abord, puis fongique, contribuent fortement à la détérioration des fonctions respiratoires. Ainsi, une importante diversité fongique a été décrite dans les sécrétions bronchiques des patients atteints de mucoviscidose ; si certaines espèces témoignent simplement d'un portage transitoire, d'autres sont réellement à l'origine de colonisations ou d'infections. A l'heure actuelle, les colonisations semblent être pour la plupart asymptomatiques, mais elles pourraient contribuer à la réaction inflammatoire et à la dégradation progressive de la fonction pulmonaire.

Avec l'amélioration des techniques d'isolement et d'identification, les espèces du genre *Scedosporium* se sont révélées comme étant des agents prépondérants dans la mucoviscidose. En effet, toutes les études montrent que les *Scedosporium* figurent au 2^{ème} rang parmi les champignons filamenteux isolés des poumons mucoviscidosiques ; en outre, les répercussions cliniques de l'isolement de ces champignons dépassent le simple cadre de la colonisation chronique. C'est pourquoi le Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP-EA 3142), dans lequel j'ai réalisé cette thèse, mène des travaux de recherche visant à déterminer les facteurs de pathogénicité de ce champignon avec pour objectif l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques, en parallèle du développement de nouveaux outils diagnostiques. La partie suivante de ce manuscrit traite des avancées les plus récentes dans la compréhension et la prise en charge des infections à *S. apiospermum* dans le contexte de mucoviscidose.

2. Scedosporium et mucoviscidose

Les moisissures du genre *Scedosporium* sont des pathogènes opportunistes responsables d'une grande variété d'infections chez l'homme, allant d'infections strictement localisées comme les mycétomes sous-cutanés jusqu'à des infections disséminées, parfois mortelles, en cas de déficit immunitaire (greffe de moelle, transplantation d'organe solide). Une attention croissante a été portée sur ces champignons au cours des deux dernières décennies, notamment en raison de leur reconnaissance comme agents d'infections respiratoires au cours de la mucoviscidose. En effet, le genre *Scedosporium* se classe au deuxième rang parmi les champignons filamenteux capables de coloniser les voies respiratoires des patients mucoviscidosiques. Pourtant, les informations concernant les mécanismes et facteurs de pathogénicité de ces champignons restent très parcellaires.

Nous proposons dans ce premier article un état des lieux des connaissances sur l'écologie, le diagnostic, les options thérapeutiques, mais aussi et surtout l'épidémiologie et les mécanismes pathogéniques permettant aux *Scedosporium* de s'établir et de persister au sein du poumon mucoviscidosique. Il s'agit d'une revue de la littérature rédigée en réponse à une invitation de l'éditeur du journal *Expert Review of Respiratory Medicine*.

2.1. Résumé

Longtemps considérés comme exclusivement responsables d'infections chroniques localisées, les champignons du genre *Scedosporium* ont récemment reçu un regain d'intérêt en raison de leur reconnaissance en tant que colonisateurs habituels des voies respiratoires des patients atteints de mucoviscidose ainsi que des descriptions d'infections disséminées au décours d'une transplantation pulmonaire. Récemment, plusieurs études ont été menées sur ces agents pathogènes, ce qui a conduit à des avancées dans la compréhension de leurs mécanismes pathogéniques et dans le diagnostic biologique des colonisations et infections respiratoires causées par ces champignons.

À partir d'une recherche bibliographique issue de la base de données MEDLINE/Pubmed, cet article résume en premier lieu nos connaissances sur la taxonomie et l'écologie des espèces de *Scedosporium*, l'épidémiologie de ces champignons et leur mécanismes pathogènes, avant de présenter les améliorations dans la détection de la colonisation des voies aériennes et le diagnostic des infections respiratoires dans la mucoviscidose, et enfin les difficultés de leur prise en charge thérapeutique ainsi que les médicaments antifongiques en développement.

2.2. Article

EXPERT REVIEW OF RESPIRATORY MEDICINE https://doi.org/10.1080/17476348.2020.1705787

REVIEW

Check for updates

Taylor & Francis

or & Francis Group

Advances in understanding and managing *Scedosporium* respiratory infections in patients with cystic fibrosis

Jean-Philippe Bouchara^a, Yohann Le Govic^a, Samar Kabbara^a, Bernard Cimon^a, Rachid Zouhair^a, Monzer Hamze^b, Nicolas Papon^a and Gilles Nevez^c

^aGroupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP, EA 3142), UNIV Angers, UNIV Brest, SFR 4208 ICAT, Angers, France; ^bLaboratoire Microbiologie Santé et Environnement (LMSE), Ecole Doctorale des Sciences et de Technologie, Faculté de Santé Publique, Université Libanaise, Tripoli, Liban; ^cGroupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP, EA 3142), UNIV Angers, UNIV Brest, Brest, France

ABSTRACT

Introduction: Considered for a long time to be exclusively responsible for chronic localized infections, fungi of the genus *Scedosporium* have recently received a renewed interest because of their recognition as common colonizing agents of the respiratory tract of patients with cystic fibrosis, and of the description of severe disseminated infections in patients undergoing lung transplantation. Recently, several studies have been carried out on these opportunistic pathogens, which led to some advances in the understanding of their pathogenic mechanisms and in the biological diagnosis of the airway colonization/respiratory infections caused by these fungi.

Areas covered: From a bibliographic search on the Pubmed database, we summarize the current knowledge about the taxonomy of *Scedosporium* species, the epidemiology of these fungi and their pathogenic mechanisms, and present the improvements in the detection of the airway colonization and diagnosis of *Scedosporium* respiratory infections, the difficulties in their therapeutic management, and the antifungal drugs in development.

Expert opinion: As described in this review, many advances have been made regarding the taxonomy and ecology of *Scedosporium* species or the molecular determinants of their pathogenicity, but also in the management of *Scedosporium* infections, particularly by improving the biological diagnostic and publishing evidence for the efficacy of combined therapy.

1. Introduction

Cystic fibrosis (CF), which is the most common genetic disease among Caucasian populations, results from mutations in the *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator) gene encoding a chloride channel located at the apical membrane of numerous epithelial cell types [1,2]. Several organs are involved in the disease, but morbidity and mortality essentially depend on the lesions of the lungs [3]. In the airways, the genetic defect leads to alterations in the electrolytic exchanges through the plasma membrane of epithelial cells, and therefore to dehydration of the bronchial mucus, allowing the entrapment, in this sticky mucus, of the airborne bacteria and fungal spores, which cause chronic respiratory infections with pulmonary exacerbations [4,5].

Bacteria are the major causative agents of these infections, and numerous works have been performed during the past decades in order to improve the prevention and treatment of bacterial respiratory infections. Progress in this field, together with the improvement of the nutritional status of the patients, and the development of an early diagnosis of the disease, resulted in a marked increase in life expectancy [6–8]. However, several fungal species may also chronically colonize the respiratory tract of the patients, sometimes causing respiratory infections or sensitization.

Candida albicans for yeasts and the opportunistic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus* are the most common in the respiratory tract of patients with CF. However, several other environmental molds are increasingly reported in the CF context, but the clinical significance of their recovery from respiratory secretions remains debated [9].

Fungi of the Scedosporium genus, whose taxonomy has evolved a great deal recently, were confined for a very long time as agents of subcutaneous mycetoma and other chronic localized infections such as bone and joint infections in immunocompetent patients. However, with the increased number of immunocompromised patients, the clinical spectrum of scedosporiosis has expanded considerably, with the description of invasive forms, particularly in bone marrow and solid organ transplant recipients [10]. In addition, these old pathogens have gained renewed attention recently, mainly because of their recognition as common colonizers of the respiratory tract in cystic fibrosis. Indeed, these fungi rank second among filamentous fungi colonizing the CF airways, after Aspergillus fumigatus. Nevertheless, great variations are reported in their frequency in CF from one study to another, at least in part because the detection of these fungi from respiratory

CONTACT Jean-Philippe Bouchara 🐼 jean-philippe.bouchara@univ-angers.fr 🕒 Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP, EA 3142), UNIV Angers, UNIV Brest, SFR 4208 ICAT, Angers, France

© 2019 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez Scedosporium apiospermum, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose

ARTICLE HISTORY Received 9 October 2019 Accepted 13 December 2019

KEYWORDS

Scedosporium; cystic fibrosis; airway colonization; respiratory infections; biological diagnosis; treatment; ecology; pathogenic mechanisms

- The genus *Scedosporium* actually comprises 10 species, five of which having been described in the CF context, with the most common being *S. boydii, S. apiospermum,* and *S. aurantiacum.*
- Usually living as soil saprophytes, particularly in human impacted environments, fungi of the genus *Scedosporium* rank second among the filamentous fungi colonizing the respiratory tract of CF patients.
- Although usually well tolerated, the airway colonization by Scedosporium species may lead to bronchitis and allergic bronchopulmonary mycoses. Additionally, it constitutes a major risk factor for a severe disseminated infection in patients undergoing lung or heartlung transplantation.
- Detection of this fungal colonization by mycological examination of respiratory secretions should be made as early as possible, at least at registration on the lung transplantation waiting list.
- Inoculation of the clinical samples on agar plates is highly recommended for examination of respiratory secretions, together with the use of a Scedosporium-selective culture medium (Sabouraud-chloramphenicol-cycloheximide for example), and a prolonged incubation time (2 weeks at 35–37°C).
- Although voriconazole remains the first-line treatment to eradicate Scedosporium species, a combination therapy consisting in voriconazole associated to an echinocandin and aerosols of amphotericin B is highly recommended.

secretions is still difficult. Likewise, the clinical significance of their isolation from respiratory secretions remains debated and the limited susceptibility or resistance of these fungi to current antifungal drugs complicates the therapeutic control of scedosporiosis, which has a poor prognosis in disseminated forms [9].

In this review based on a bibliographic search on the Pubmed database using the keywords *Scedosporium* and Taxonomy, Ecology, Diagnosis, Pathogenesis or Treatment, the numerous changes in the taxonomy of *Scedosporium* species will be summarized. Then, we will synthesize the recent advances in the understanding of the ecology of these fungi and of their pathogenic mechanisms and discuss the difficulties of the biological diagnosis of the airway colonization/respiratory infections and of the therapeutic management of the patients.

2. Taxonomy

Until the early 2000s, only two species were recognized in the genus Scedosporium: Scedosporium apiospermum (formerly Monosporium apiospermum, and initially considered as the asexual state of Pseudallescheria boydii, formerly Allescheria boydii) and Scedosporium prolificans (formerly Scedosporium inflatum) which reproduces exclusively under an asexual state [10]. Nevertheless, regarding Scedosporium apiospermum, a great variability could be seen from strains to strains in the macroscopic and microscopic morphology, in agreement with the high polymorphism found in the first genotype studies performed on this fungus [11-13]. Important taxonomic studies were therefore conducted by Gilgado et al. [14-16]; by comparison of 60 epidemiologically unrelated isolates morphologically, physiologically and on the molecular level (sequencing of the internal transcribed spacer - ITS - regions 1 and 2 of ribosomal DNA - rDNA-, of the calmodulin gene, and of two loci in the beta-tubulin gene - TUB and BT2), Gilgado et al. [14-16] demonstrated that Scedosporium apiospermum and Pseudallescheria boydii are two distinct entities, and three new species were described, namely Scedosporium dehoogii, Pseudallescheria minutispora and Scedosporium aurantiacum.

Another milestone in the taxonomic changes within the Scedosporium genus was the approval by all members of the international working group on Pseudallescheria/Scedosporium infections, launched by both the European Confederation of Medical Mycology (ECMM) and the International Society for Human and Animal Mycology (ISHAM), to apply the Amsterdam declaration of fungal nomenclature 'One Fungus – One Name' [17] and to stop dual taxonomy resulting from the two modes of reproduction that can be seen in fungi. In a joint paper, the five entities described by Gilgado et al. [14-16] were recognized as distinct species, and Scedosporium prolificans, which was found to be genetically distant from the other species, were reassigned to the genus Lomentospora and is now called Lomentospora prolificans. Moreover, there was an agreement to maintain the genus name Scedosporium; the genus name Pseudallescheria, therefore, should no longer be used [18].

Later on, other *Scedosporium* species were described. For example, by the analysis of ITS, BT2 and calmodulin sequences, *Scedosporium cereisporum* which is phylogenetically close to *S. aurantiacum*, was described from fluids of a wastewater treatment plant (WWTP) in Western France [19]. Thus, the *Scedosporium* genus currently comprises 10 species, namely *S. minutisporum*, *S. desertorum*, *S. cereisporum*, *S. aurantiacum* and *S. dehoogii*, in addition to the members of the *S. apiospermum* complex, that are *S. fusoideum*, *S. angustum*, *S. apiospermum*, *S. ellipsoideum* and *S. boydii* (Figure 1) [10].

3. Colonization of the airways by *Scedosporium* species

Despite a great variability in their prevalence rate from one study to another, Scedosporium species rank second among the filamentous fungi colonizing the CF airways in all studies that used a Scedosporium-selective culture medium for the mycological examination of respiratory secretions. For instance, in a longitudinal study encompassing 128 patients with CF who were followed-up for 5 years, A. fumigatus was the most common filamentous fungus (46.1% of the patients), followed by Scedosporium spp. (8.6% of the patients) and Aspergillus terreus (6.2%) [20]. This was confirmed in several studies performed in Germany [21-25], Austria [26] and Australia [27]. In a multicenter study encompassing 161 patients followed-up in four CF centers from Germany (Berlin, Bonn, Munich, and Tübingen), respective prevalence rates of 39.8% and 16% were reported for repeated isolation of A. fumigatus and Scedosporium species [24]. Likewise, respective prevalence rates of 66.6% and 11.5% for A. fumigatus and Scedosporium species were found by the follow-up of 69 patients in Sydney (Australia) [27].

Scedosporium species are late-colonizers of CF airways. The airway colonization is seldom found in young children and it usually follows bacterial and *Aspergillus* infections. Mean age of the patients at date of the first colonization by a *Scedosporium* species was reported to be about 14.5 years, whereas it was of 5.4, 8.1 and 12.9 years for *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas*

EXPERT REVIEW OF RESPIRATORY MEDICINE 🛞 3



Figure 1. Phylogenetic tree of *Scedosporium* species based on tubulin sequences (*TUB*, exons 5 and 6) representing the currently known genetic variation, using maximum likelihood analysis (GTR model). Bootstrap values were calculated using 200 replicates and a cutoff of 80%. Type strains are in bold italics. *Lomentospora prolificans* is presented as outgroup. Genbank accession number of the nucleotide sequence is given in parenthesis for each strain. CBS: Centraalbureau voor schimmelcultures (Westerdijk Institute, Utrecht, The Netherlands); FMR: Facultad de Medicina, Reus (Tarragona, Spain); IHEM: Institute of Hygiene and

CBS: Centraalbureau voor schimmelcultures (Westerdijk Institute, Utrecht, The Netherlands); FMR: Facultad de Medicina, Reus (Tarragona, Spain); IHEM: Institute of Hygiene and Epidemiology – Mycology section (Sciensano, Brussels, Belgium); UA: University of Angers (Angers, France).

aeruginosa and *A. fumigatus*, respectively [20], thus suggesting that lesions of the epithelial cells due to prior bacterial or *Aspergillus* infections are required for development of *Scedosporium* species in the CF bronchial mucus.

Species distribution in patients with CF was investigated in several studies, sometimes showing some geographical differences (Table 1). Thus, *S. aurantiacum* was highly prevalent in Australia since it was recovered from half of the *Scedosporium*-positive patients [27], whereas *S. boydii* predominated in France with a prevalence of 62% among positive patients, followed by *S. apiospermum* (24%), *S. aurantiacum* (10%) and *S. minutisporum* (4%) [28]. In contrast with data from France, *S. apiospermum* seemed to be much more prevalent in Germany [22,24,25].

Colonization of the airways by *Scedosporium* species, which is usually chronic with repeated isolations of the fungus for several months or years [20], is usually well tolerated. However, these fungi are not commensals of the respiratory tract, and it is likely

Table 1. Species distribution in patients with cystic fibrosis.

Scedosporium species	France [28]	Australia ^a [27]	Germany [22]	Germany ^b [24]	Germany ^c [25]	
S. apiospermum	24%	50%	55%	57.7%	57.6%	
S. boydii	62%		33%	65.4%	34.6%	
S. aurantiacum	10%	50%	6%	7.7%	11.5%	
S. minutisporum	4%	/	6%	/	3.8%	

Data that are presented correspond to the respective frequency of each species among the *Scedosporium*-sputum culture positive patients.

^aScedosporium apiospermum and S. boydii were not differentiated in this study.
^bTwo Scedosporium species were detected for 8 out of the 26 Scedosporiumculture positive patients included in this study.

^cTwo *Scedosporium* species were detected for 3 out of the 26 *Scedosporium*culture positive patients included in this study. that their long-lasting presence in the bronchi contributes to the maintenance of the chronic inflammatory response which leads to the progressive deterioration of the lung function, as demonstrated for *A. fumigatus* [29–32]. Moreover, this fungal colonization may be responsible in CF patients for various infections ranging from bronchitis to severe disseminated infections, principally in immunocompromised hosts [33–45].

In non-transplanted patients, documented cases of scedosporiosis remain rare. In a patient that was chronically colonized with *Scedosporium*, a pulmonary mycetoma has developed; however, a cerebral involvement complicated the situation which rapidly led to the patient's death [33]. Similarly, spondylodiscitis was reported in a CF patient colonized by *Scedosporium* and the unique risk factor that was identified for hematogenous spread was a corticosteroid-induced diabetes [34].

Some cases of allergic bronchopulmonary mycosis (ABPM) have also been reported [20]. Involvement of *Scedosporium* species in these cases was based on the presence of episodes of bronchospasm and labile pulmonary infiltrates, a high titer of total serum IgE without serum specific anti-*Aspergillus* IgE, associated during the acute phases with blood eosinophilia, repeated isolations of the fungus from sputum without any other fungal pathogen and detection of serum specific anti-*Scedosporium* antibodies, and improvement of the patient following treatment with both corticosteroids and itraconazole.

In addition, because of their propensity for hematogenous spread in case of immunodeficiency, these thermotolerant fungi may cause severe and often fatal disseminated infections in patients undergoing lung or heart-lung transplantation [35–45]. In some cases, these infections occurred while

4 😉 J.-P. BOUCHARA ET AL.

the fungus has never been reported before transplantation. However, no information was given in these case reports on the procedure used for mycological examination of the samples before transplantation. Therefore, one cannot disregard a prior colonization of the airways by Scedosporium which has been missed because of the lack of selective culture media and of the overgrowth of some fungal co-colonizers like A. fumigatus, masking the presence of Scedosporium. Indeed, in many cases, the patient's history reveals an already known colonization of the airways by a Scedosporium species before the transplantation [36-39,41,42]. A prior airway colonization by Scedosporium is therefore considered a risk factor for the development of an invasive infection in the days following the transplantation, and in light of the severity of these infections, an appropriate antifungal treatment before transplantation is mandatory in colonized CF patients.

4. Ecology of Scedosporium species

4.1. Ecological niches of Scedosporium species

Fungi of the genus Scedosporium are usually soil saprophytes, with a worldwide distribution. These fungi have been reported from all continents and from a large diversity of nutrient-rich substrates, including guano of bats, chickens and blackbirds, manure of livestock, poultry or cattle, ditch muds, pond bottoms, swamps, muds of coastal tidelands, polluted waters and WWTP effluents (for a review, see Rougeron et al. [46]). The isolation of these fungi from these substrates may be explained by their ability to survive in poorly aerated environments, their tolerance to high salt concentrations and osmotic pressures, and their ability to use aliphatic hydrocarbons or aromatic pollutants as a source of carbon and energy. Nevertheless, all these reports deal with sporadic isolations, and the ecology of Scedosporium species has been clarified only recently thanks to the development of selective culture media using the resistance of these fungi to benomyl, or the particular biochemical properties of these fungi. For instance, Rainer et al. [47] described a semi-selective culture medium, called Sce-Sel +, containing dichloran and benomyl, but the highest selectivity and sensitivity were obtained with the Scedo-Select III culture medium which combines these inhibitors and the use of 4-hydroxybenzoate as the sole carbon source [48].

Environmental studies conducted using these culture media demonstrated the impact of human activities on the ecology of *Scedosporium* species. Indeed, almost all soil samples from coniferous or deciduous forests, beaches, and sand dunes were free of these fungi, whereas the highest densities were found from agricultural areas, muds from WWTPs, city parks and playgrounds, and industrial areas [49,50]. Soil samples from city parks and industrial areas also constituted the best sources from *Scedosporium* isolation in Mexico [51] or Thailand [52,53], and an environmental study performed in Sydney (Australia) and its surroundings revealed a decreasing gradient of fungal density with the distance from city center [54]. Studies should be conducted to elucidate the molecular basis of the degradation of aromatic pollutants which provides to these fungi a selective advantage in polluted environments,

and of their tolerance to the usually toxic heavy metals which also accumulate in such environments.

4.2. Species distribution in the environment

Geographic variations have been reported in the respective frequencies of the different species. Scedosporium apiospermum, S. boydii and S. aurantiacum were equally represented is soil samples from Western France [50], whereas S. apiospermum largely predominated in Austria and The Netherlands [49] or in Thailand [53], and S. aurantiacum in Sydney [54]. Scedosporium minutisporum was reported only from a few samples collected in Austria and The Netherlands [49] or in Western France [50], in agreement with its paucity in CF patients [22,25,28]. By contrast, if only a few isolates of S. dehoogii have been reported in Australia, Chile, and Thailand [53-55], this species was relatively common in Europe [49,50], particularly in Western France where it was the most abundant species in the environment, whereas it has never been described in the CF context. Future studies should be focused on S. dehoogii in order to elucidate why this species common in the environment is not capable to chronically colonize the CF airways.

4.3. Scedosporium species in the indoor environment

Despite their relatively common occurrence in CF, very few studies investigated the presence of *Scedosporium* species in the indoor environment. Beguin and Nolard [56] investigated the air and surfaces in 130 dwellings in Brussels (Belgium) and found *Scedosporium* sp. only once, ranking 49th among the fungal genera detected and representing only one colony forming unit (CFU) for a total number of about 20,000 CFUs. Likewise, analysis of five potted plants from a Canadian hospital suggested potted plants as a risk factor for fungal contamination of immunosuppressed patients [57].

Unpublished data from our laboratory confirmed this finding [58]. Air samples from patients colonized by Scedosporium were taken from their bedroom, the living room, and bathroom. Surfaces in the same rooms were also sampled, as well as water from the bathtub (or aquarium if any). Litter of cats and compost and soil from the garden for patients living in individual houses were also sampled, but also the soil from all potted plants present at home of the patients. Scedosporium species were never recovered from the air and water samples, nor from the litter of pets or compost samples from gardens, and only one CFU was recovered from the 60 surface samples analyzed (from the heat radiator in one patient's bedroom). By contrast, 55 potted plants were sampled and among them, 38 revealed to be culture-positive for Scedosporium species. The fungi were isolated at home of the six patients, and most samples revealed a high fungal load. More, isolates from potted plants were compared to those recovered from sputum samples collected from the same patients during the study period. For each patient, random amplification of polymorphic DNA (RAPD), using the three-primer set GC70, UBC 701 and UBC 703 that we described [11,12], showed a unique genotype for clinical isolates, and conversely a great diversity of genotypes for isolates collected from potted plants, but interestingly for patient 3, two environmental isolates were found

EXPERT REVIEW OF RESPIRATORY MEDICINE 🛞 5

to be closely related to the clinical isolates (Figure 2). Although this study was conducted by RAPD, before the taxonomic revisions in the *Scedosporium* genus and therefore without precise species identification, it clearly showed that potted plants constitute a reservoir of *Scedosporium* species and suggest them as a source of contamination for patients with CF. Nevertheless, this study was conducted by parallel inoculation of the samples on Sabouraud-cycloheximide and dichloranrose Bengale-chloramphenicol (DRBC)-agar supplemented with benomyl. Therefore, one cannot disregard the presence of other reservoirs of these fungi in the indoor environment, and other studies should be conducted using the abovementioned highly selective culture media Sce-Sel+ or Scedo-Select III.

4.4. Mode of contamination of the patients

Scedosporium species cause a wide variety of infections resulting from different modes of contamination. Traumatic inoculation of fungal elements with soiled skin wounds, plant stings, or soiled garden tools is usually the cause of subcutaneous mycetoma or bone and joint infections. By contrast, the mode of contamination is more questionable for the airway colonization/respiratory infections in patients with CF, as for disseminated infections in lung transplant recipients. A respiratory portal of entry is very likely, through inhalation of some airborne spores. Nevertheless, despite a huge number of aeromycological studies, only five reported the isolation of Scedosporium species from air samples [56,59-62], and in most of them, these fungi were underrepresented. For example, Ceylan et al. [59] analyzed by cultivation on standard mycological culture media the air in the living-room at home of 242 individuals in Izmir (Turkey) and Scedosporium species accounted for only 0.7% of the total number of fungal colonies. Compared to A. fumigatus conidia, the larger size of Scedosporium conidia (6 to 14 µm long vs. 2 to 3 µm in diameter) and their shape (ovoid to club-shaped vs. globose) may be responsible for faster sedimentation. Nevertheless, the lack of selectivity in the detection methods used in these aeromycological studies should also be considered, and new investigations should be carried out using molecular detection techniques, or the highly selective culture media recently described [47,48].

5. Pathogenic mechanisms of Scedosporium species

An important research area in the framework of the ECMM/ ISHAM working group *Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis* (*Fri-CF*) aimed to identify the pathogenic mechanisms of *Scedosporium* species. As mentioned above, all aeromycological studies that have been performed regarding thermotolerant fungi revealed the rarity of *Scedosporium* species,

а		Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
	Potted plants	9	5	10	7	13	11
	Scedosporium-culture positive plants	8	4	5	6	7	8



Figure 2. Potted plants, a reservoir of *Scedosporium* species and a possible source of contamination of patients with cystic fibrosis. **A**: Detection of these fungi from soil samples from potted plants present at home of six patients with cystic fibrosis. **B**: Electrophoretic pattern of environmental or clinical *Scedosporium* isolates collected for Patient 3.

Isolates recovered from potted plants present at home or from the garden for patient 3 (lanes 1–14: IHEM 20987, 20988, 20989, 20990, 20991, 22350, 22351, 22352, 22353, 20811, 20812, 20,813, 20814 and 20815; lane 15: AU 70400633; lanes 16–20: IHEM 22354, 22355, 22356, 22357, and 22358; lane 21: UA 70400397/2; lanes 22–24: IHEM 22419, 22359 and 22360) were compared by random amplification of polymorphic DNA to clinical isolates recovered from a sputum sample from the same patient and preserved in our culture collection (lanes 25–28: 40310009 colony 1 to 4). Amplicons generated by primer UBC-703 were separated on 1.5% agarose gels, showing a unique electrophoretic pattern for the clinical isolates and conversely, a great diversity of genotypes for environmental isolates, with two isolates on lanes 13 and 14 belonging to the same genotype than clinical isolates, and similar conclusions were found with primers GC70 and UBC701. Lanes M, DNA size markers (100-bp ladder from Amersham Pharmacia-Biotech). IHEM: Institute of Hygiene and Epidemiology – Mycology section (Sciensano, Brussels, Belgium); UA: University of Angers (Angers, France).

contrasting with the abundance in the air of many other thermotolerant fungi which have never been reported in CF. This discrepancy raises the question of specific virulence factors in *Scedosporium* species.

5.1. Biochemistry of Scedosporium species

The few biochemical studies carried out on the cell wall of Scedosporium species have shown the presence of rhamnomannans, mainly in the form of peptidorhamnomannans which are thought to be involved in adherence to epithelial cells [63,64], and of α -glucans which are recognized by cells of the innate immune system through the Toll like receptor (TLR) 2 [65] whereas rhamnomannans are recognized by TLR4 [66]. The wall also comprises ß-glucans and chitin, as well as proteins and lipids, including glycosylceramides which are implicated in fungal growth and differentiation, and thus considered as virulence factors [67]. The cell wall, however, is a dynamic structure; it undergoes important rearrangements during germination of the conidia and hyphal elongation [68]. Likewise, cell wall changes were described during maturation of the conidia, with a progressive increase in the rate of the cell wall polysaccharides which elicit the immune response, however, masked by the progressive accumulation of melanin at the spore surface [69]. Indeed, conidia of Scedosporium species are covered by a melanin layer, produced through the dihydroxynaphthalene (DHN) pathway, as it occurs in A. fumigatus where melanin has been described to play a key role in protecting the spores against the reactive oxygen species (ROS) produced by phagocytic cells [70]. On the other hand, atomic force microscopy demonstrated the lack of rodlets at the spore surface in S. boydii [69]. Scedosporium spores thus differ from A. fumigatus conidia which produce a small hydrophobic molecule called RodAp forming a rodlet layer at the conidial surface that contributes to evasion of the conidia to the host immune defenses [71].

Scedosporium boydii also produces various proteolytic enzymes, including a metalloprotease [72], and a serine protease of the subtilisin family [73], as well as some enzymes degrading ROS [74,75]. In addition, acid and alkaline phosphatases have also been described at the hyphal surface [76].

Nevertheless, until the end of the last decade, our knowledge on the biochemistry and physiology of *Scedosporium* species was really limited, because of the lack of genomic data available for these microorganisms. Only three proteins potentially involved in virulence were purified and characterized: the previously mentioned subtilisin, and two enzymes potentially involved in ROS detoxification, the cytosolic Cu, Zn-superoxide dismutase (SOD), and a typical monofunctional catalase that is secreted by the fungus [73–75]. Likewise, only the genes encoding these enzymes, *SODC* and *CATA1*, were identified and sequenced in *S. boydii* [69,74], as well as two other genes encoding enzymes involved in the synthesis of DHN-melanin of the conidial wall, *PKS1* encoding a polyketide synthase and *4HNR* encoding the tetrahydroxynaphtalenereductase [77].

Scedosporium species also produce other secondary metabolites, some of which contributing to virulence. Two hydroxamate siderophores have been characterized, dimerumic acid and N^{α} -methyl coprogen B [78], which are potentially involved in the uptake of the extracellular iron that is essential for many physiological processes within the fungal cell, like respiration or synthesis of membrane ergosterol. As most microorganisms, *Scedosporium* species are unable to directly assimilate the extracellular iron, and secrete in their environment small molecules, called siderophores, which complex the extracellular iron, thus permitting its uptake through specific membrane permeases. Interestingly, the *in vivo* production of N^{α} methylcoprogen was demonstrated since it was detected from sputum samples of CF patients colonized by a *Scedosporium* species [79].

5.2. Functional genomic and 'omics' approaches in Scedosporium species

Faster progress in the elucidation of the pathogenic mechanisms of Scedosporium species should derive from the recent availability of the whole genome of S. apiospermum [80] since it paves the way for functional genomics studies and constitutes a cornerstone for the development of 'omics' approaches. As an example, one may cite the recent assembly of the sequence data of a second species of the Scedosporium genus, S. aurantiacum [81] and the assembly and annotation of the genome sequence of a second strain of S. apiospermum [82], and of a first strain of S. boydii [83] and S. dehoogii (to be published) (Table 2). The genome of S. apiospermum IHEM 14462, originally isolated from respiratory secretions of a French CF patient, comprises about 10,920 coding sequences (CDS), with a biological function assigned to about 8000 of them. By comparison, the genome of the environmental strain S. aurantiacum WM 09.24 exhibited a reduced size (39.89 Mbp) and a slightly reduced number of CDS (10,525), like the genome of the environmental strain S. dehoogii UA 120008799-01/4 (41.19 Mbp) while the genome of S. boydii IHEM 23826, also isolated from a French CF patient, was close to that of S. apiospermum with a whole size of 43.3

Table 2. Genome size and organization in Scedosporium species.

Table 2. Genome size and organization in scedosponum species.									
Species and strain	Genome size (Mbp)	Number of contigs	Number of CDS	GC%	GenBank accession number	Reference			
S. apiospermumIHEM 14462	43.44	176	10,919 (2,544 pseudogenes)	50.1	JOWA0000000.1	80			
S. apiospermum HDO1	44.19	211	11,278	49.9	MVOQ0000000.1	82			
S. aurantiacum WM 09.24	39.9	1,584	10,525	49.2	JUDQ0000000.1	81			
S. boydii IHEM 23826	43.3	587	11,694	50.7	NJFT0000000.1	83			
S. dehoogii UA 120008799-01/4	41.19	448	Not annotated	ND	PGIR0000000.1	Unpublished			

CDS: coding sequences. IHEM: Institute of Hygiene and Epidemiology – Mycology section (Sciensano, Brussels, Belgium). GC: guanine-cytosine. HDO: Museo de Historia Natural ANDES (Bogotá, Colombia). Mbp: Mega base pairs. ND: Not determined. UA: University of Angers (Angers, France). WM: Wieland Meyer culture collection (Sydney, Australia).

EXPERT REVIEW OF RESPIRATORY MEDICINE 🛛 7

Mbp (Table 2). With the development of whole-genome sequencing, the genome of additional environmental or clinical isolates should be sequenced to perform comparative genomic studies searching for genes shared by pathogenic isolates but lacking in environmental isolates, which could therefore be linked to pathogenesis.

Likewise, the recent disruption of *SODC* gene in *S. aurantiacum* demonstrated the greater susceptibility of the disruptants to superoxide anions, with only a delayed entry into the lag phase in the presence of hydrogen peroxyde, but a lack of growth in the presence of the SOD anions-generator menadione [84]. These data support the role of SODC in virulence of the fungus, but more importantly, by providing the first procedure for gene disruption within the *Scedosporium* genus, this study paves the way for functional genomic studies in the *Scedosporium* genus.

'Omic' approaches have also been initiated. Proteomic studies are currently undergone by Ramirez-Garcia et al. [85] in order to identify candidates for the development of diagnostic tools for Scedosporium infections. Likewise, another proteomic study focused on the glycosylphosphatidylinositol (GPI)anchored cell wall proteins illustrated the biochemical changes that occurred in the cell wall during germination [68]. Beside some proteins shared by conidia and hyphae, 12 were detected exclusively from the hyphal wall extract, and one from the conidial wall only, corresponding to another SOD (called SODD) which may contribute to evasion of the conidia to the host immune defenses. A particular attention, therefore, should be paid to this enzyme, which could play an important role in the establishment of the fungus within the respiratory tract of CF patients, since conidia are thought to be the infective form of the fungus.

Recently, a first transcriptomic study was conducted focused on enzymes potentially involved in ROS detoxification in *S. apiospermum* [86]. CDS possibly involved in ROS detoxification were identified in the draft genome sequence of *S. apiospermum* IHEM 14462 and the expression level of these genes was quantified following exposure of short hyphae to H_2O_2 or the ROS generators menadione and paraquat, or in co-cultures of germ tubes with activated macrophages or neutrophils. Nineteen of these 29 CDS were found to be overexpressed in at least one of the experimental conditions, but two of them encoding the peroxyredoxin Saprx2 and *SAPIO_CDS1830* encoding a thioredoxin reductase were overexpressed in the four conditions, showing the importance of the thioredoxin system in evasion to the host immune response.

Considering the role of secondary metabolites in virulence of other fungal pathogens, large-scale metabolomic studies should also be conducted. Recently a bioinformatic analysis focused on the nonribosomal peptide synthetases (NRPS) revealed the presence in *S. apiospermum* genome of nine gene clusters, comprising a unique NRPS gene as core member and additional genes coding for enzymes/proteins involved in the biosynthesis or transport of these natural products [87]. Six of these NRPS genes exhibited sufficient similarities with other fungal NRPS to predict the class of secondary metabolites. Two gene clusters are involved in the synthesis of cyclopeptides, *i.e. SAPIO_CDS6317* and *SAPIO_CDS10511* which comprise six and four adenylation

domains, respectively. Studies are needed to identify the product(s) of these gene clusters, which could be the pseudacyclins A to E described by Pavlaskova et al. [88]. Two other NRPS gene clusters are possibly responsible for the synthesis of epidithiodioxopiperazines (ETPs) which are secondary metabolites characterized by a diketopiperazine ring and an intramolecular disulfide bridge responsible for detoxification of ROS through redox cycling: the ETP1828 gene cluster is potentially responsible for the synthesis of some acetylaranotin derivatives called boydins A, B, C and D [89,90], whereas the product of the ETP10275 gene cluster is more questionable. Of note, Li et al. [91] previously reported the production of another ETP, gliotoxin, which is known in A. fumigatus to play an important role in evasion to the host immune defenses [92]. Finally, two other NRPS clusters are involved in the biosynthesis of siderophores: SAPIO_CDS2806 which should encode an extracellular siderophore involved in iron uptake and close to the A. fumigatus fusarinine C (possibly the previously described N^a-methylcoprogen B), and SAPIO_CDS9032 which should encode an intracellular siderophore involved in storage of iron within the fungal cell and close to A. fumigatus ferricrocin. Organization of these clusters and of the other genes potentially involved in iron metabolism in S. apiospermum was investigated recently, together with the expression level of these genes under iron-restricted or ironoverloaded culture conditions [93]. Several genes involved in siderophore synthesis or reductive assimilation (RIA) were significantly overexpressed under iron-restricted conditions and conversely repressed in the presence of an excess of iron. Moreover, these experiments demonstrated the importance of siderophore-mediated iron uptake compared to RIA. Genes encoding these NRPS should be disrupted in order to define the chemical structure of the corresponding siderophores and to demonstrate the essential role or iron uptake in the physiology of these fungi and in their pathogenicity, which could lead to the identification of new antifungal targets.

This bioinformatic analysis also revealed the presence in the genome of *S. apiospermum* IHEM 14462 of at least nine polyketide synthases (PKS), five hybrids NRPS-PKS, and seven other secondary metabolite (including terpene and indole compounds) biosynthetic gene clusters [87]. Studies therefore should be conducted in order to identify the products of these gene clusters which could be helpful for diagnosis or treatment.

Elucidation of *Scedosporium* metabolome may also help to understand the interactions between *Scedosporium* species and co-colonizers. For example, we have demonstrated an anti-*Staphylococcus aureus* activity for *S. boydii* which is supported by a secreted polyketide called boydone A [94], but antagonistic interactions were also reported between *Scedosporium* species and other bacteria associated with CF. For instance, colonization of the airways by bacteria and antibacterial treatments influence the colonization by *Scedosporium* species [24,27,95]. In agreement with our results, Blyth *et al.* [27] reported prior anti-staphylococcal treatment as a risk factor for the airway colonization by *Scedosporium* spp. In addition, they showed that a prior colonization by *Pseudomonas aeruginosa* protects the patients against *Scedosporium* species and *vice versa*. This antagonism which was supported recently by *in vitro* experiments showing growth

8 😉 J.-P. BOUCHARA ET AL.

inhibition of *S. aurantiacum* by *P. aeruginosa* [96] may be caused by competition between the microorganisms for the extracellular iron, but the production by *Scedosporium* species and *P. aeruginosa* of secondary metabolites with antipseudomonal or antifungal properties, respectively, should also be investigated. Nevertheless, these interactions were not confirmed by Schwarz *et al.* [24] who found an increased rate of co-colonization with mucoid phenotype of *P. aeruginosa* in *Scedosporium*-colonized CF patients, and conversely a significantly decreased frequency of *Haemophilus influenzae* independently of the age or gender. Further epidemiological investigations, together with metagenomic studies of the lung microbiome, should help to understand the complex bacterial-fungal interactions in the CF bronchial mucus.

6. Biological diagnosis

If a chronic subcutaneous or bone and joint infection, as well as a lung fungus ball in patients with tuberculous cavitations, may be easily diagnosed by culture and histological examination of appropriate clinical specimens, together with the detection of serum specific IgG by counter-immunoelectrophoresis (CIE), the detection of an airway colonization by *Scedosporium* species still remains challenging, as well as the differentiation between a chronic colonization of the airways and a respiratory infection or an allergic broncho-pulmonary mycosis (ABPM).

6.1. Mycological examination

The frequency of *Scedosporium* species in CF greatly varies from one study to another. In addition to variations in the geographical distribution of *Scedosporium* species or in the population studied (pediatric patients *vs.* adults), these discrepancies could be due to the lack of standardization of mycological examination of sputum samples [97–100]. Samples are inoculated only on bacteriological culture media in some centers. In addition, even when mycological culture media are used, there are great variations in the nature and number of the culture media, as well as in the duration and temperature of incubation. Moreover, some centers only use agar slants, which offer a very limited surface for fungal growth compared to agar plates.

Although *Scedosporium* species are capable to grow on blood agar, inoculation of the samples on mycological culture media greatly facilitates the detection of fungi. For instance, fungal surveillance is not routinely performed in most CF centers in the USA, and in 2017, Hong *et al.* [101] reported a marked increase in the prevalence rate of *A. fumigatus* (40.8%) and *S. apiospermum* (5.2%) compared to the national prevalence rates of these fungi (20.4% and 1.9%, respectively) with the use of Sabouraud dextrose agar. Likewise, by inhibiting the growth of bacteria, supplementation of the culture medium with antibiotics dramatically increases the recovery rate of fungi [102].

Prior homogenization of the samples with a mucolyticum is also mandatory [26], but standard mycological culture media are not sufficient to detect an airway colonization by *Scedosporium* species [21]. In our experience, they were associated with the more rapidly and more extensively growing fungus *A. fumigatus* in most cases (10/11 *Scedosporium*culture positive patients). Therefore, detection of these fungi was made possible by the use of a selective culture medium, for instance Sabouraud dextrose agar containing chloramphenicol and supplemented with cycloheximide which inhibits the growth of the aspergilli but not of *Scedosporium* species [20]. Likewise, Sedlacek *et al.* [22] reported a two-fold increase in the recovery rate of *Scedosporium* species with the use of Sce-Sel+ culture medium.

All together these studies demonstrate the urgent need for guidelines regarding the mycological examination of sputum samples from patients with CF, which are also mandatory for improved knowledge on the epidemiology of fungal airway colonization or respiratory infections. In this aim, two collaborative studies were published recently. From a 3-year prospective study encompassing seven CF centers in France, it was proposed to inoculate the samples after homogenization with a mucolyticum on four culture media including a selective culture medium for detection of *Scedosporium* species [103], but these results were not confirmed in a short scale international study (469 samples) performed in 18 CF centers in Europe, and one in Australia, perhaps in relation with the short duration of this study and the limited number of samples analyzed and patients involved [104].

Despite some phenotypic differences in mature colonies, such as colony color or spore size and shape, precise species identification within the *Scedosporium* genus cannot be achieved without the use of molecular techniques [99,105–107], especially TUB sequencing. Matrix Assisted Laser Desorption Ionization – Time Of Flight/Mass Spectrometry (MALDI-TOF/MS) may constitute a valuable alternative since it allows the differentiation of five *Scedosporium* species [108], but an improvement of the databases is still required with the recent recognition of five additional species in the *Scedosporium* genus.

6.2. Molecular diagnosis

Several molecular methods based on PCR amplification of the ITS 1 or 2 regions of rDNA or the BT2 locus have been proposed allowing the detection of Scedosporium spp., and for some of them the differentiation between species (for a review, see Chen et al. [99]). Likewise, the loop-mediated isothermal amplification initially developed for the identification of Scedosporium species [105] and reverse line blot hybridization have been tested for detection of these fungi from sputum samples [109,110]. These techniques, however, are of limited interest. Actually, the clinical signs and symptoms of a Scedosporium infection are not specific and, if it is important to diagnose a colonization of the respiratory tract by a Scedosporium species, it remains necessary to detect all the fungal species that may be present in the CF lungs. In this context, DNA chips amplifying the ITS 1 and 2 regions of rDNA have been developed, allowing both detection and direct identification of the different yeast species or filamentous fungi colonizing the airways of patients suffering from CF or responsible for respiratory infections in this clinical context [111]. About 20 species (yeasts and filamentous fungi)

could be detected simultaneously. DNA chips allowing the detection and identification of 14 fungal species from blood samples, bronchoalveolar lavage (BAL) or biopsies were also developed for the diagnosis of febrile episodes in immunosuppressed patients [112]. A multiplex PCR has been developed allowing rapid detection (less than 2 h) and direct identification of 11 fungal pathogens on positive blood cultures [113]. The panel of fungal species detected by these methods, however, is limited. Another approach called PCR-ESI-TOF MS (ElectroSpray Ionization-Time Of Flight/Mass Spectrometry) appears very promising. This technique, proposed for the detection of fungal pathogens on blood samples, BAL, or tissue biopsies in case of febrile episodes in immunocompromised patients, is based on the amplification of conserved sequences of the genome such as ITS regions, genes encoding beta-tubulin or calmodulin, and the analysis of the amplified products by mass spectrometry [114-116]. Nearly 200 fungal species can be identified, in 8 h, by this fully automated technique. Further studies are needed to evaluate this technique, which could be of particular interest in severe disseminated infections after lung transplantation. For example, this method permitted to confirm the involvement of another CF-associated fungus, Rasamsonia argillacea, in a fatal-disseminated infection that occurred in a CF patient following lung transplantation [117]. PCR-ESI-TOF/MS allowed the detection and identification of the fungus from formalinfixed and paraffin-embedded tissue sections from myocardium and lung whereas no amplification of the ITS or D1/D2 regions of rDNA was obtained by the classical panfungal DNA sequencing.

6.3. Genotyping

The development of molecular techniques has also made possible genotype studies for epidemiological purposes [99,118]. Thus, multiple isolates originating from the same sample as well as sequential isolates from successive samples taken from the same patient were compared by RAPD. These experiments demonstrated that the colonization of the CF airways by Scedosporium species is usually due to a single genotype [12] and that S. apiospermum, S. boydii, S. aurantiacum and S. minutisporum are all capable to establish chronically in the respiratory tract [12,28]. A few cases of disseminated scedosporiosis following lung transplantation in CF patients have also been studied by this technique [37,38], which confirmed the presence of a single genotype. Interestingly, as described for the fatal disseminated infection mentioned above with Rasamsonia argillacea [117], RAPD demonstrated in the case reported by Symoens et al. [37] that isolates collected from this patient after transplantation belonged to the same genotype than those recovered up to 2 years before transplantation. This observation established the chronic colonization of the airways by Scedosporium species as a major risk factor for a disseminated infection after lung transplantation, which justifies the need to detect a chronic colonization by Scedosporium species at least before registration on the transplantation waiting list.

Recently, more reproducible techniques have been proposed, including internal transcribed spacer-restriction

EXPERT REVIEW OF RESPIRATORY MEDICINE 😔 9

fragment length polymorphism (ITS-RFLP) analysis, ITS sequencing, and M13 PCR fingerprinting [119], or multi loci sequence typing (MLST), which is today the gold standard [99,120]. Likewise, the semi-automated Diversilab system demonstrated its efficacy for both precise species identification and genotyping within the *Scedosporium* genus. Sixty-three multiple or sequential isolates collected from nine CF patients and belonging to the four major pathogenic species, *S. apiospermum, S. boydii, S. aurantiacum,* and *S. ellipsoideum,* were compared by RAPD, MLST, and analysis of repetitive sequences by rep-PCR using the Diversilab system [121]. rep-PCR clearly differentiated the four species, and also permitted strain differentiation within each species, providing results in close agreement with those from MLST and RAPD.

6.4. Serodiagnosis

Considering the lack of commercial or in-house developed serological assays for the detection of Scedosporium-specific IgE antibodies, the detection of serum specific IgG antibodies in patients with Scedosporium-positive sputum cultures is required for the diagnosis of ABPM, together with the presence of a blood eosinophilia and an elevated total serum IgE titer [20]. Detection of Scedosporium-specific IgG antibodies may also be useful for differentiation between airway colonization and a chronic respiratory infection [122]. However, this serodiagnosis is performed only in specialized laboratories by CIE using crude antigenic extracts. Therefore, one cannot disregard cross-reactions due to the numerous proteins and polysaccharides that are shared with the aspergilli. Significant improvements in the serodiagnosis may derive from the use of selected purified antigens, or recombinant proteins mimicking selected Scedosporium antigens. Recombinant proteins mimicking CatA1 and SODC were produced in Pichia pastoris and Escherichia coli, respectively [122]. Value of these recombinant proteins was investigated in ELISA assays, using sera from CF patients classified into four groups according to the results from sputum cultures and from CIE with an A. fumigatus or a S. apiospermum antigenic extract. These recombinant proteins revealed to be useful tools for standardization of the serodiagnosis since they allowed the detection of a Scedosporium infection and the differentiation with an Aspergillus infection by combining the results from the two ELISA assays [122].

7. Treatment of Scedosporium infections

7.1. In vitro susceptibility to antifungals and current therapeutic options

Despite the availability of several antifungal drugs since the beginning of the century, treatment of *Scedosporium* infections remains difficult. *In vitro*, these fungi are insensitive or resistant to most current antifungals, but progress has been made with combinations of drugs and the identification of new therapeutic targets.

5-fluorocytosine, polyenes (amphotericin B, nystatin), imidazoles and first-generation triazoles (especially ketoconazole and fluconazole) have no activity against these fungi [123–128]. Itraconazole also has limited efficacy against Scedosporium isolates. For instance, the first three cases of airway colonization in CF patients that have been reported, were diagnosed following itraconazole treatment for a respiratory infection due to A. fumigatus [129]. Voriconazole exhibits greater efficacy, showing the lowest minimum inhibitory concentrations (MICs) against all Scedosporium species [123]. Posaconazole is slightly less active [124], but it has been shown to be effective in mice or rat models of scedosporiosis [130,131] and, although not licensed for this indication, this triazole may have some interest in disseminated infections [45]. As for the echinocandins, although they exhibit some in vitro activity [128,132], Scedosporium species are considered intrinsically resistant to these drugs because of the presence of a phenylalanyl residue at position 695 in the sequence of the Fks1 protein, the target of echinocandins [133]. Finally, isavuconazole was disappointing against Scedosporium species, being much less active than voriconazole [132], but further evaluation is needed since lower MICs were reported for some isolates using the E-test strips [134].

For these reasons, voriconazole is recommended today as first-line therapy for Scedosporium infections [135]. Differences in antifungal susceptibility, however, have been reported between Scedosporium species, S. aurantiacum usually being less susceptible [126,128], but also in the same species from one strain to another. Precise identification of the species involved and study of the susceptibility of the patient's isolate therefore are required to adapt the treatment. Regarding voriconazole, it has been suggested that a MIC lower than 2 $\mu g/$ mL could be indicative of a favorable outcome whereas isolates with MIC \ge 4 µg/ml showed limited response to treatment [136] which may explain some therapeutic failures with this drug. In the case reported by Symoens et al. [37], despite a six-month duration of the treatment which permitted the disappearing of the clinical signs and symptoms, the fungus was not eradicated and the patient died of a disseminated infection with cerebral involvement some days after treatment arrest.

Given the low effectiveness of available antifungals, the use of combinations of antifungal drugs therefore has emerged for treatment of *Scedosporium* infections. Thirty-five double combinations were tested against different *Scedosporium* species [137]. A synergy was observed *in vitro* between voriconazole or posaconazole and an echinocandin [137], and there is now accumulating evidence to recommend a double or triple antifungal combination for the treatment of a severe *Scedosporium* infection, especially the association of voriconazole plus caspofungin and aerosols of amphotericin B [25].

7.2. Antifungal drugs under development

Among drugs in development, only a few have been evaluated against *Scedosporium* species. For instance, SCY-078 (formerly MK3118), a semi-synthetic derivative of the natural compound enfumagin which is a potent inhibitor of fungal beta-1,3-D-glucane synthases, but structurally different from the echinocandins, revealed limited activity against *Scedosporium* species [138].

Conversely, promising results have been reported for two other compounds. Considering the role-played by

GPI-anchored cell wall proteins in virulence of many fungal pathogens, a library of chemical compounds was screened searching for inhibitors of the inositol acylation step in GPI anchor biosynthesis pathway. This led to the discovery of an oxazole ring derivative called E1210 that inhibits in vitro the activity of GPI synthetase in many pathogenic yeasts or molds, including Scedosporium species [139,140]. Several isolates of S. apiospermum and S. aurantiacum were tested, and this compound revealed to be more active than all the comparators, including voriconazole, with MICs ranging between 0.03 and 0.25 µg/ml [140]. This first-in-class broad spectrum antifungal, now called manogepix (APX001A), also showed efficacy in murine models of candidiasis, aspergillosis, and fusariosis [141,142], and the N-phosphonooxymethyl prodrug fosmanogepix (APX001, formerly E1211), which is rapidly converted to the active moiety after intravenous or oral administration, was recently announced to protect immunosuppressed mice from scedosporiosis [143].

Likewise, dihydroorotate dehydrogenase which is an important enzyme in pyrimidine biosynthesis, is inhibited by a novel class of antifungal drugs called orotomides, especially Olorofim (formerly F901318) which exhibits potent *in vitro* activity against *Aspergillus* species and difficult-to-treat molds [144]. Recently, Wiederhold *et al.* [145] and Biswas *et al.* [146] compared Olorofim and current antifungals against a large panel of *Scedosporium* (*S. apiospermum, S. boydii, S. aurantiacum* and *S. dehoogii*) and *L. prolificans* isolates. Olorofim was the only drug showing *in vitro* activity against *L. prolificans*, and, it showed greater or equal activity compared to voriconazole against *Scedosporium* isolates.

Inhalation of N-chlorotaurine has also been suggested as adjuvant therapy for eradication of the different microorganisms colonizing the CF airways, including Scedosporium species, as well as for treatment or prophylaxis of respiratory infections (for a review, see Nagl et al. [147]). Likewise, because of its shorter duration to marketing and reduced cost compared to the development of new antifungal drugs, repositioning of old drugs has been extensively investigated in the past few years [148]. For instance, it was demonstrated that Auranofin which is patented as an antirheumatic agent since more than 30 years, exhibits a broad-spectrum antifungal activity, being active against yeasts, but also against some environmental molds including Scedosporium species and L. prolificans [149]. In light of the role played by thioredoxin reductases in evasion of Scedosporium species to the host immune defenses [86], further studies should be conducted on auranofin which targets the thioredoxin system [150].

8. Conclusion

With the worldwide recognition of *Scedosporium* species as siginificant pathogens in CF, numerous works have been carried out on these fungi in recent decades, which made possible to specify their ecology and to identify domestic reservoirs, and which permitted to develop new tools for ecological studies, biological diagnosis, genotype studies or elucidation of their pathogenic mechanisms. Although data on the pathogenic mechanisms of these fungi are still limited, the recent availability of the genome of four *Scedosporium* species should

EXPERT REVIEW OF RESPIRATORY MEDICINE 🛞 11

facilitate the advancement of knowledge in this field. The treatment of *Scedosporium* infections, which should rely on double or triple antifungal combinations, must be adapted to the isolated strain by an *in vitro* study of antifungal susceptibility. Nevertheless, several molecules are currently under development and functional genomics and 'omics' studies should also allow the identification of new therapeutic targets.

9. Expert opinion

As described in this review article, many advances have been made in recent years regarding the taxonomy and ecology of Scedosporium species. Likewise, the availability of the whole genome sequence of several Scedosporium species and the development of various omics approaches have also provided new insights into the mechanisms underlying the hostpathogen interactions, especially by unraveling some pathogenic factors of these fungi that could potentially emerge as new targets for drug development. Finally, major progress has been made in the management of these infections, particularly by improving the biological diagnostic and by publishing recently clinical evidence for the efficacy of antifungal combinations for the treatment of a Scedosporium infection. However, much remains to be done in these fields so that in the near future these infections can be better prevented, diagnosed earlier and treated more effectively.

Even at the level of the pathogenic processes inherent to *Scedosporium* lung colonization, many questions remain unsolved and it becomes essential to decipher the underlying mechanisms of the airway colonization by these fungi to fight more efficiently the life-threatening infections these fungi may cause in case of immunodeficiency.

A first and major unresolved question is why is Scedosporium lung colonization so prevalent in the context of cystic fibrosis (CF). Indeed, the presence of contaminating spores of Scedosporium in the air was shown to be very low compared to other environmental molds such as A. fumigatus and contrastingly, it ranks second among the filamentous fungi that are able to chronically colonize the respiratory tract of patients with CF. While it is completely conceivable that A. fumigatus is highly prevalent in this clinical context because its spores are omnipresent in the air, it is really a matter to understand how Scedosporium species that poorly sporulate and with no spores detected in the air, can reach a frequency of roughly 10% of CF patients. One of the main keys for answering this pending question would be to consider that the particular thick mucus that accumulates in the respiratory track of CF patient is strongly selective for fungal colonization. The defective efflux of chloride and bicarbonate anions resulting from mutations in the gene CFTR leads to many changes in the physico-chemical properties of the bronchial mucus: decreased osmotic pressure, acidic pH, increased carbon dioxide and decreased oxygen levels, increased concentration of lactates resulting from the fermentative activity of the cells, ... We are progressively acquiring experimental evidences that Scedosporium species display marked capacities to adapt to this specific microenvironment.

Apart from the context of lung transplantation, the colonization process by *Scedosporium* remains fairly well tolerated by patients. Although some cases of respiratory infections or bronchopulmonary allergic mycosis due to *Scedosporium* species have been reported, the clinical expression resulting from the fungal colonization of the CF airways is generally from low to absent. This raises the second pending question of why the colonization process by *Scedosporium* is well tolerated by patients with CF, whereas in other clinical settings the fungus is able to cause marked symptoms. Once again, investigations should be conducted on the influence of the composition of the CF mucus on the metabolism of *Scedosporium* species. More precisely, one may speculate that the CF mucus could induce a reduction in the expression of some pathogenic traits of these fungi, for example the production of toxic secondary metabolites, to prevent exacerbation of the immune response, notably the macrophagemediated oxidative burst and the production of reactive oxygen species.

Beyond to be able to answer these crucial questions and thus to advance our knowledge on the pathogenesis of the airway colonization and fungal infections, the fact remains that special attention should be focused on improving patient management. The indoor reservoirs of these fungi should be identified and the mode of contamination of the patients should be established. Priority also should be given to develop innovative diagnostic strategies for very early detection of airway colonization by Scedosporium species, and to standardization of the procedures used for mycological examination of the respiratory secretions. Standardized methods for diagnosis of a respiratory infection or an allergic broncho-pulmonary mycosis and the differentiation with a chronic colonization of the airways should be developed. In addition, although some candidate molecules are currently in the pipeline as introduced in the last section of this review, another challenge of major importance remains to identify new active compounds to fight these multiresistant fungi.

Funding

This paper was not funded.

Declaration of interest

The authors have no relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript. This includes employment, consultancies, honoraria, stock ownership or options, expert testimony, grants or patents received or pending, or royalties.

Reviewer disclosures

Peer reviewers on this manuscript have no relevant financial or other relationships to disclose.

References

Papers of special note have been highlighted as either of interest (•) or of considerable interest (••) to readers.

 Hamutcu R, Rowland JM, Horn MV, et al. Clinical findings and lung pathology in children with cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2002;165:1172–1175. 12 😉 J.-P. BOUCHARA ET AL.

- Morrissey BM, Schock BC, Marelich GP, et al. Cystic fibrosis in adults: current and future management strategies. Clin Rev Allergy Immunol. 2003;25:275–287.
- Castellani C, Assael BM. Cystic fibrosis: a clinical view. Cell Mol Life Sci. 2017;74:129–140.
- Riordan JR. CFTR function and prospects for therapy. Annu Rev Biochem. 2008;77:701–726.
- 5. Moran O. The biophysics, biochemistry and physiology of CFTR. Cell Mol Life Sci. 2017;74:1–2.
- George AM, Jones PM, Middleton PG. Cystic fibrosis infections: treatment strategies and prospects. FEMS Microbiol Lett. 2009;300:153–164.
- Cohen-Cymberknoh M, Shoseyov D, Kerem E. Managing cystic fibrosis: strategies that increase life expectancy and improve quality of life. Am J Respir Crit Care Med. 2011;183:1463–1471.
- Langan KM, Kotsimbos T, Peleg AY. Managing *Pseudomonas aeruginosa* respiratory infections in cystic fibrosis. Curr Opin Infect Dis. 2015;28:547–556.
- Schwarz C, Vandeputte P, Rougeron A, et al. and the ECMM/ISHAM working group *Fungal respiratory infections in Cystic Fibrosis (Fri-CF)*. Developing collaborative works for faster progress on fungal respiratory infections in cystic fibrosis. Med Mycol. 2018;56(Suppl. 1):46–59.
- Ramirez-Garcia A, Pellon A, Rementeria A, et al. Scedosporium and Lomentospora: an updated overview of underrated opportunists. Med Mycol. 2018;56(Suppl. 1):102–125.
- The paper provides the last update on taxonomy of Scedosporium species.
- Zouhair R, Defontaine A, Ollivier C, et al. Typing of Scedosporium apiospermum by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA. J Med Microbiol. 2001;50:925–932.
- Defontaine A, Zouhair R, Cimon B, et al. Genotyping study of Scedosporium apiospermum isolates from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2002;40:2108–2114.
- Rainer J, de Hoog GS, Wedde M, et al. Molecular variability of *Pseudallescheria boydii*, a neurotropic opportunist. J Clin Microbiol. 2000;38(9):3267–3273.
- Gilgado F, Cano J, Gené J, et al. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. J Clin Microbiol. 2005;43:4930–4942.
- Gilgado F, Cano J, Gené J, et al. Molecular and phenotypic data supporting distinct species statuses for Scedosporium apiospermum and Pseudallescheria boydii and the proposed new species Scedosporium dehoogii. J Clin Microbiol. 2008;46:766–771.
- Gilgado F, Gené J, Cano J, et al. Heterothallism in Scedosporium apiospermum and description of its teleomorph Pseudallescheria apiosperma sp. nov. Med Mycol. 2010;48:122–128.
- Hawksworth DL, Crous PW, Redhead SA, et al. The Amsterdam declaration on fungal nomenclature. IMA Fungus. 2011;2:105–112.
- Lackner M, de Hoog SG, Yang L, et al. Proposed nomenclature for *Pseudallescheria, Scedosporium* and related genera. Fungal Divers. 2014;67(1):1–10.
- Crous PW, Wingfield MJ, Burgess TI, et al. Fungal Planet description sheets: 469–557. Persoonia. 2016;37:218–403.
- 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;19:53–56.
- Horré R, Marklein G, Siekmeier R, et al. Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients. Respiration. 2009;77:320–324.
- Sedlacek L, Graf B, Schwarz C, 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;14:237–241.
- 23. 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(8):781–786.

- 24. Schwarz C, Brandt C, Antweiler E, et al. Prospective multicenter German study on pulmonary colonization with *Scedosporium/ Lomentospora* species in cystic fibrosis: epidemiology and new association factors. PLoS One. 2017;12(2):e0171485.
- Schwarz C, Brandt C, Melichar V, et al. Combined antifungal therapy is superior to monotherapy in pulmonary scedosporiosis in cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2019;18(2):227–232.
- •• The paper provides strong evidence for the benefit of combined antifungal therapy for treatment of *Scedosporium* infections.
- Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, et al. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. Med Mycol. 2014;52(2):179–186.
- 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.
- Zouhair R, Rougeron A, Razafimandimby B, et al. Distribution of the different species of the *Pseudallescheria boydii/Scedosporium apiospermum* complex in French patients with cystic fibrosis. Med Mycol. 2013;51:603–613.
- 29. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, et al. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. Chest. 2010;137:171–176.
- Fillaux J, Brémont F, Murris M, et al. Assessment of Aspergillus sensitization or persistent carriage as a factor in lung function impairment in cystic fibrosis patients. Scand J Infect Dis. 2012;44:842–847.
- Hong G, Alby K, Ng SCW, et al. The presence of *Aspergillus fumiga*tus is associated with worse respiratory quality of life in cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2019 Aug 21;pii: \$1569–1993 (19):30840–30849.
- Russell GK, Gadhok R, Simmonds NJ. The destructive combination of Scedosporium apiospermum lung disease and exuberant inflammation in cystic fibrosis. Ped Respir Rev. 2013;14:22–25.
- Borghi E, latta R, Manca A, et al. Chronic airway colonization by Scedosporium apiospermum with fatal outcome in a patient with cystic fibrosis. Med Mycol. 2010;48(Suppl 1):S108–13.
- Guignard S, Hubert D, Dupont B, et al. Multifocal Scedosporium apiospermum spondylitis in a cystic fibrosis patient. J Cyst Fibros. 2008;7:89–91.
- 35. Morin O, Haloun A, Treilhaud M, et al. Mycose systémique à *Pseudallescheria boydii* chez une patiente greffée bipulmonaire pour une mucoviscidose. Etude des souches isolées en RAPD. J Mycol Méd. 1999;9:119–123.
- 36. Castiglioni B, Sutton DA, Rinaldi MG, et al. *Pseudallescheria boydii* (anamorph *Scedosporium apiospermum*). Infection in solid organ transplant recipients in a tertiary medical center and review of the literature. Medicine (Baltimore). 2002;81:333–348.
- Symoens F, Knoop C, Schrooyen M, et al. Disseminated Scedosporium apiospermum infection in a cystic fibrosis patient after double-lung transplantation. J Heart Lung Transplant. 2006;25:603–607.
- The paper illustrates the risk for a severe disseminated infection in already colonized patients undergoing lung transplantation.
- Morio F, Horeau-Langlard D, Gay-Andrieu F, et al. Disseminated Scedosporium/Pseudallescheria infection after double-lung transplantation in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2010;48:1978–1982.
- Luijk B, Ekkelenkamp MB, De Jong PA, et al. Effective prolonged therapy with voriconazole in a lung transplant recipient with spondylodiscitis induced by *Scedosporium apiospermum*. Case Rep Infect Dis. 2011;2011:460313.
- Hirschi S, Letscher-Bru V, Pottecher J, et al. Disseminated *Trichosporon* mycotoxinivorans, Aspergillus fumigatus and Scedosporium apiospermum coinfection after lung and liver transplantation in a cystic fibrosis patient. J Clin Microbiol. 2012;50:4168–4170.

EXPERT REVIEW OF RESPIRATORY MEDICINE 🛞 13

- Miraldi F, Anile M, Ruberto F, et al. Scedosporium apiospermum atrial mycetomas after lung transplantation for cystic fibrosis. Transpl Infect Dis. 2012;14:188–191.
- Rolfe NE, Haddad TJ, Wills TS. Management of Scedosporium apiospermum in a pre- and post-lung transplant patient with cystic fibrosis. Med Mycol. 2013;2:37–39.
- Hartmann C, Müller C, Weißbrodt H, et al. Successful prevention of scedosporiosis after lung transplantation in a cystic fibrosis patient by combined local and systemic triazole therapy. Med Mycol Case Rep. 2013;2:116–118.
- Doligalski CT, Benedict K, Cleveland AA, et al. Epidemiology of invasive mold infections in lung transplant recipients. Am J Transplant. 2014;14(6):1328–1333.
- 45. Solé A, García-Robles AA, Jordá C, et al. Salvage therapy with topical posaconazole in lung transplant recipients with invasive *Scedosporium* infection. Am J Transplant. 2018;18(2):504–509.
- Rougeron A, Giraud S, Alastruey-Izquierdo A, et al. Ecology of Scedosporium species: present knowledge and future research. Mycopathologia. 2018;183(1):185–200.
- The paper provides the last update on ecology of Scedosporium species.
- 47. Rainer J, Kaltseis J, de Hoog SG, et al. Efficacy of a selective isolation procedure for members of the *Pseudallescheria boydii* complex. Antonie Van Leeuwenhoek. 2008;93:315–322.
- Pham T, Giraud S, Schuliar G, et al. Scedo-select III: a new semi-selective culture medium for detection of the Scedosporium apiospermum species complex. Med Mycol. 2015;53(5):512–519.
- Kaltseis J, Rainer J, de Hoog GS. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in human-dominated and natural environments and their distribution in clinical samples. Med Mycol. 2009;47:398–405.
- 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(4):1039–1048.
- Elizondo-Zertuche M, Treviño-Rangel R DJ, Robledo-Leal E, et al. Molecular identification and *in vitro* antifungal susceptibility of *Scedosporium* complex isolates from high-human-activity sites in Mexico. Mycologia. 2017;109(6):874–881.
- Luplertlop N, Pumeesat P, Muangkaew W, et al. Environmental screening for the Scedosporium apiospermum species complex in public parks in Bangkok, Thailand. PLoS One. 2016;11(7):e0159869.
- 53. Luplertlop N, Muangkaew W, Pumeesat P, et al. Distribution of *Scedosporium* species in soil from areas with high human population density and tourist popularity in six geographic regions in Thailand. PLoS One. 2019;14(1):e0210942.
- 54. Harun A, Gilgado F, Chen SC, et al. 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.
- 55. Alvarez E, Sanhueza C. New record of Scedosporium dehoogii from Chile: phylogeny and susceptibility profiles to classic and novel putative antifungal agents. Rev Iberoam Micol. 2016;33(4):224–229.
- Beguin H, Nolard N. Mould diversity in homes. Air and surface analysis of 130 dwellings. Aerobiologica. 1994;10:157–166.
- Summerbell RC, Krajden S, Kane J. Potted plants in hospitals as reservoirs of pathogenic fungi. Mycopathologia. 1989;106:13–22.
- Sidot C, Cimon B, Bouchara JP, et al. Scedosporium apiospermum. Environmental study in the homes of patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2007;6(Suppl 1):S29.
- 59. Ceylan E, Ozkutuk A, Ergor G, et al. Fungi and indoor conditions in asthma patients. J Asthma. 2006;43:789–794.
- Araujo R, Cabral JP, Rodrigues AG. Air filtration systems and restrictive access conditions improve indoor air quality in clinical units: *Penicillium* as a general indicator of hospital indoor fungal levels. Am J Infect Control. 2008;36:129–134.
- Saldanha R, Manno M, Saleh M, et al. The influence of sampling duration on recovery of culturable fungi using the Andersen N6 and RCS bioaerosol samplers. Indoor Air. 2008;18:464–472.

- 62. Ramos CA, Viegas C, Verde SC, et al. Characterizing the fungal and bacterial microflora and concentrations in fitness centres. Indoor Built Environ. 2016;25:872–882.
- Pinto MR, Mulloy B, Haido RM, et al. A peptidorhamnomannan from the mycelium of *Pseudallescheria boydii* is a potential diagnostic antigen of this emerging human pathogen. Microbiology. 2001;147:1499–1506.
- 64. Pinto MR, de Sá AC, Limongi CL, et al. Involvement of peptidorhamnomannan in the interaction of *Pseudallescheria boydii* and HEp2 cells. Microbes Infect. 2004;6:1259–1267.
- 65. Bittencourt VC, Figueiredo RT, da Silva RB, et al. An alpha-glucan of *Pseudallescheria boydii* is involved in fungal phagocytosis and toll-like receptor activation. J Biol Chem. 2006;281:22614–22623.
- 66. Figueiredo RT, Bittencourt VC, Lopes LC, et al. Toll-like receptors (TLR2 and TLR4) recognize polysaccharides of *Pseudallescheria boydii* cell wall. Carbohydr Res. 2012;356:260–264.
- 67. Pinto MR, Rodrigues ML, Travassos LR, et al. Characterization of glucosylceramides in *Pseudallescheria boydii* and their involvement in fungal differentiation. Glycobiology. 2002;12:251–260.
- 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(6): e0128680.
- Ghamrawi S, Renier G, Saulnier P, et al. Cell wall modifications during maturation of conidia in the human pathogenic fungus, *Pseudallescheria boydii*. PLoS One. 2014;9:e100290.
- Heinekamp T, Thywißen A, Macheleidt J, et al. Aspergillus fumigatus melanins: interference with the host endocytosis pathway and impact on virulence. Front Microbiol. 2013;3:440.
- Aimanianda V, Latgé JP. Fungal hydrophobins form a sheath preventing immune recognition of airborne conidia. Virulence. 2010;1:185–187.
- da Silva BA, Dos Santos AL, Barreto-Bergter E, et al. Extracellular peptidase in the fungal pathogen *Pseudallescheria boydii*. Curr Microbiol. 2006;53:18–22.
- Larcher G, Cimon B, Symoens F, et al. A 33-kDa serine proteinase from Scedosporium apiospermum. Biochem J. 1996;315:119–126.
- 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;9:558–565.
- 75. 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.
- Kiffer-Moreira T, Pinheiro AA, Pinto MR, et al. Mycelial forms of *Pseudallescheria boydii* present ectophosphatase activities. Arch Microbiol. 2007;188:159–166.
- 77. 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(12):1322–1333.
- Bertrand S, Larcher G, Landreau A, et al. Hydroxamate siderophores of Scedosporium apiospermum. Biometals. 2009;22:1019–1029.
- Bertrand S, Bouchara JP, Venier MC, et al. N(α)-methyl coprogen B, a potential marker of the airway colonization by *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. Med Mycol. 2010;48 (Suppl 1):S98–107.
- Vandeputte P, Ghamrawi S, Rechenmann M, et al. Draft genome sequence of the pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. Genome Announc. 2014;2(5):pii: e00988–14.
- The paper provides the first genome sequence for the *Scedosporium* genus and thus paved the way for omics approaches regarding these fungi.
- Pérez-Bercoff Å, Papanicolau A, Ramsperger M, et al. Draft genome of the opportunistic human pathogen *Scedosporium aurantiacum* – Australian environmental strain WM 09.24.. Genome Announc. 2015;3(1):pii: e01526–14.
- 82. Morales LT, González-García LN, Orozco MC, et al. The genomic study of an environmental isolate of *Scedosporium apiospermum*

14 🕢 J.-P. BOUCHARA ET AL.

shows its metabolic potential to degrade hydrocarbons. Stand Genomic Sci. 2017;12:71.

- Duvaux L, Shiller J, Vandeputte P, et al. Draft genome sequence of the human-pathogenic fungus *Scedosporium boydii*. Genome Announc. 2017;5(37):pii: e00871–17.
- Pateau V, Razafimandimby B, Vandeputte P, et al. Gene disruption in Scedosporium aurantiacum: proof of concept with the disruption of SODC gene encoding a cytosolic Cu,Zn-superoxide dismutase. Mycopathologia. 2018;183(1):241–249.
- The paper describes method for gene disruption in Scedosporium species and thus paves the way for functional genomic studies and elucidation of the pathogenic factors of these fungi.
- Ramirez-Garcia A, Pellon A, Buldain I, et al. Proteomics as a tool to identify new targets against *Aspergillus* and *Scedosporium* in the context of cystic fibrosis. Mycopathologia. 2018;183(1):273–289.
- Staerck C, Tabiasco J, Godon C, et al. Transcriptional profiling of Scedosporium apiospermum enzymatic antioxidant gene battery unravels the involvement of thioredoxin reductases against chemical and phagocytic cells oxidative stress. Med Mycol. 2019;57 (3):363–373.
- Le Govic Y, Papon N, Le Gal S, et al. Non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the human pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. Front Microbiol. 2019;10:2062.
- Pavlaskova K, Nedved J, Kuzma M, et al. Characterization of pseudacyclins A-E, a suite of cyclic peptides produced by Pseudallescheria boydii. J Nat Prod. 2010;73:1027–1032.
- Wu Q, Jiang N, Bo Han W, et al. Antibacterial epipolythiodioxopiperazine and unprecedented sesquiterpene from *Pseudallescheria boydii*, a beetle (coleoptera)-associated fungus. Org Biomol Chem. 2014;12:9405–9412.
- Lan WJ, Wang KT, Xu MY, et al. Secondary metabolites with chemical diversity from the marine-derived fungus *Pseudallescheria boydii* F19–1 and their cytotoxic activity. RSC Adv. 2016;6:76206–76213.
- Li X, Kim SK, Nam KW, et al. A new antibacterial dioxopiperazine alkaloid related to gliotoxin from a marine isolate of the fungus *Pseudallescheria*. J Antibiot (Tokyo). 2006;59(4):248–250.
- Scharf DH, Heinekamp T, Remme N, et al. Biosynthesis and function of gliotoxin in Aspergillus fumigatus. Appl Microbiol Biotechnol. 2012;93(2):467–472.
- Le Govic Y, Papon N, Le Gal S, et al. Genomic organization and expression of iron metabolism genes in the emerging pathogenic mold *Scedosporium apiospermum*. Front Microbiol. 2018;9:827.
- Staerck C, Landreau A, Herbette G, et al. The secreted polyketide boydone A is responsible for the anti-*Staphylococcus aureus* activity of *Scedosporium boydii*. FEMS Microbiol Lett. 2017;364:22.
- Hong G, Lechtzin N, Hadjiliadis D, et al. Inhaled antibiotic use is associated with *Scedosporium/Lomentospora* species isolation in cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2019;54(2):133–140.
- Chen SC, Patel S, Meyer W, et al. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Scedosporium* and *Lomentospora in vitro*. Mycopathologia. 2018;183(1):251–261.
- Borman AM, Palmer MD, Delhaes L, 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.
- Boyle M, Moore JE, Whitehouse JL, et al. Laboratory diagnosis and characterization of fungal disease in patients with cystic fibrosis (CF): a survey of current UK practice in a cohort of clinical microbiology laboratories. Mycopathologia. 2018;183 (4):723–729.
- Chen SC, Meyer W, Pashley CH. Challenges in laboratory detection of fungal pathogens in the airways of cystic fibrosis patients. Mycopathologia. 2018;183(1):89–100.
- Boyle M, Moore JE, Whitehouse JL, et al. The diagnosis and management of respiratory tract fungal infection in cystic fibrosis: a UK survey of current practice. Med Mycol. 2019;57(2):155–160.

- Hong G, Miller HB, Allgood S, et al. Use of selective fungal culture media increases rates of detection of fungi in the respiratory tract of cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2017;55(4):1122–1130.
- 102. Nagano Y, Millar BC, Goldsmith CE, et al. Development of selective media for the isolation of yeasts and filamentous fungi from the sputum of adult patients with cystic fibrosis (CF). J Cyst Fibros. 2008;7(6):566–572.
- 103. Coron N, Pihet M, Fréalle E, et al. Toward the standardization of mycological examination of sputum samples in cystic fibrosis: results from a French multicenter prospective study. Mycopathologia. 2018;183(1):101–117.
- •• The paper provides the first attempt for standardization of the procedures for mycological examination of respiratory secretions from CF patients.
- 104. Delhaes L, Touati K, Faure-Cognet O, et al. Prevalence, geographic risk factor, and development of a standardized protocol for fungal isolation in cystic fibrosis: results from the international prospective study "MFIP". J Cyst Fibros. 2019;18(2):212–220.
- 105. Lu Q, Gerrits van den Ende AH, Bakkers JM, et al. Identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species by three molecular methods. J Clin Microbiol. 2011;49:960–967.
- 106. Lackner M, Najafzadeh MJ, Sun J, et al. Rapid identification of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* strains by using rolling circle amplification. Appl Environ Microbiol. 2012;78:126–133.
- Lackner M, Klaassen CH, Meis JF, et al. Molecular identification tools for sibling species of *Scedosporium* and *Pseudallescheria*. Med Mycol. 2012;50:497–508.
- 108. Sitterlé E, Giraud S, Léto J, et al. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for fast and accurate identification of *Pseudallescheria/Scedosporium* species. Clin Microbiol Infect. 2014;20:929–935.
- 109. Lu Q, van den Ende AH, de Hoog GS, et al. Reverse line blot hybridisation screening of *Pseudallescheria/Scedosporium* species in patients with cystic fibrosis. Mycoses. 2011;54(Suppl 3):5–11.
- Chen M, Kondori N, Deng S, et al. Direct detection of *Exophiala* and *Scedosporium* species in sputa of patients with cystic fibrosis. Med Mycol. 2018;56(6):695–702.
- 111. Bouchara JP, Hsieh HY, Croquefer S, et al. Development of an oligonucleotide array for direct detection of fungi in sputum samples from patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2009;47:142–152.
- 112. Spiess B, Seifarth W, Hummel M, et al. DNA microarray-based detection and identification of fungal pathogens in clinical samples from neutropenic patients. J Clin Microbiol. 2007;45:3743–3753.
- 113. Lau A, Sorrell TC, Chen S, et al. Multiplex tandem PCR: a novel platform for rapid detection and identification of fungal pathogens from blood culture specimens. J Clin Microbiol. 2008;46:3021–3027.
- 114. Wolk DM, Kaleta EJ, Wysocki VH. PCR-electrospray ionization mass spectrometry: the potential to change infectious disease diagnostics in clinical and public health laboratories. J Mol Diagn. 2012;14:295–304.
- 115. Shin JH, Ranken R, Sefers SE, et al. Detection, identification, and distribution of fungi in bronchoalveolar lavage specimens by use of multilocus PCR coupled with electrospray ionization/mass spectrometry. J Clin Microbiol. 2013;51:136–141.
- 116. Simner PJ, Uhl JR, Hall L, et al. Broad-range direct detection and identification of fungi by use of the PLEX-ID PCR-electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) system. J Clin Microbiol. 2013;51:1699–1706.
- 117. Hong G, White M, Lechtzin N, et al. Fatal disseminated Rasamsonia infection in cystic fibrosis post-lung transplantation. J Cyst Fibros. 2017;16(2):e3–7.
- The paper illustrates the risk for a severe disseminated infection in already colonized patients undergoing lung transplantation.
- Harun A, Perdomo H, Gilgado F, et al. Genotyping of *Scedosporium* species: a review of molecular approaches. Med Mycol. 2009;47:406–414.

EXPERT REVIEW OF RESPIRATORY MEDICINE 🛞 15

- 119. Delhaes L, Harun A, Chen SC, et al. Molecular typing of Australian *Scedosporium* isolates showing genetic variability and numerous *S. aurantiacum*. Emerg Infect Dis. 2008;14:282–290.
- Bernhardt A, Sedlacek L, Wagner S, et al. Multilocus sequence typing of Scedosporium apiospermum and Pseudallescheria boydii isolates from cystic fibrosis patients. J Cyst Fibros. 2013;12:592–598.
- 121. Matray O, Mouhajir A, Giraud S, et al. Semi-automated repetitive sequence-based PCR amplification for species of the *Scedosporium apiospermum* complex. Med Mycol. 2016;54(4):409–419.
- 122. Mina S, Staerck C, Marot A, et al. Scedosporium boydii CatA1 and SODC recombinant proteins, new tools for serodiagnosis of Scedosporium infection of patients with cystic fibrosis. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017;89(4):282–287.
- The paper provides the first attempt for the development of a standardized assay for serodiagnosis of a Scedosporium infection.
- 123. Cuenca-Estrella M, Ruiz-Díez B, Martínez-Suárez JV, et al. Comparative *in-vitro* activity of voriconazole (UK-109,496) and six other antifungal agents against clinical isolates of *Scedosporium prolificans* and *Scedosporium apiospermum*. J Antimicrob Chemother. 1999;43:149–151.
- 124. Carrillo AJ, Guarro J. In vitro activities of four novel triazoles against Scedosporium spp. Antimicrob Agents Chemother. 2001;45:2151–2153.
- 125. Meletiadis J, Meis JF, Mouton JW, et al. EUROFUNG Network. *In vitro* activities of new and conventional antifungal agents against clinical *Scedosporium* isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2002;46:62–68.
- 126. Gilgado F, Serena C, Cano J, et al. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50:4211–4213.
- 127. Alastruey-Izquierdo A, Cuenca-Estrella M, Monzón A, et al. Prevalence and susceptibility testing of new species of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* in a collection of clinical mold isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2007;51:748–751.
- 128. Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, et al. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56:2635–2642.
- Chabasse D, Bouchara JP, Chazalette JP, et al. Mucoviscidose et colonisation fongique à *Scedosporium apiospermum*. A propos de trois observations. J Mycol Méd. 1991;1:152–155.
- Lelièvre B, Legras P, Godon C, et al. Experimental models of disseminated scedosporiosis with cerebral involvement. J Pharmacol Exp Ther. 2013;345:198–205.
- Rodríguez MM, Pastor FJ, Salas V, et al. Experimental murine scedosporiosis: histopathology and azole treatment. Antimicrob Agents Chemother. 2010;54:3980–3984.
- 132. Lackner M, Rezusta A, Villuendas MC, et al. Infection and colonisation due to *Scedosporium* in Northern Spain. An *in vitro* antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates. Mycoses. 2011;54(Suppl 3):12–21.
- 133. Johnson ME, Katiyar SK, Edlind TD. New Fks hot spot for acquired echinocandin resistance in *Saccharomyces cerevisiae* and its contribution to intrinsic resistance of *Scedosporium* species. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:3774–3781.
- Trovato L, Scalia G, Palermo CI, et al. Evaluation of isavuconazole MIC strips for susceptibility testing of *Aspergillus* and *Scedosporium* species. Med Mycol. 2019;57(4):429–433.
- 135. Tortorano AM, Richardson M, Roilides E, et al. European society of clinical microbiology and infectious diseases fungal infection study

group; European confederation of medical mycology. ESCMID and ECMM joint guidelines on diagnosis and management of hyalohyphomycosis: *Fusarium* spp., *Scedosporium* spp. and others. Clin Microbiol Infect. 2014;20(Suppl 3):27–46.

- The paper provides the first guidelines for treatment of severe disseminated infections caused by Scedosporium species.
- 136. Martin-Vicente A, Guarro J, González GM, et al. Voriconazole MICs are predictive for the outcome of experimental disseminated scedosporiosis. J Antimicrob Chemother. 2017;72(4):1118–1122.
- 137. Cuenca-Estrella M, Alastruey-Izquierdo A, Alcazar-Fuoli L, et al. In vitro activities of 35 double combinations of antifungal agents against Scedosporium apiospermum and Scedosporium prolificans. Antimicrob Agents Chemother. 2008;52:1136–1139.
- 138. Lamoth F, Alexander BD. Antifungal activities of SCY-078 (MK-3118) and standard antifungal agents against clinical non-*Aspergillus* mold isolates. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59 (7):4308–4311.
- 139. Miyazaki M, Horii T, Hata K, et al. *In vitro* activity of E1210, a novel antifungal, against clinically important yeasts and molds. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:4652–4658.
- 140. Castanheira M, Duncanson FP, Diekema DJ, et al. 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;56:352–357.
- 141. Hata K, Horii T, Miyazaki M, et al. Efficacy of oral E1210, a new broad-spectrum antifungal with a novel mechanism of action, in murine models of candidiasis, aspergillosis, and fusariosis. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55:4543–4551.
- 142. Wiederhold NP, Najvar LK, Shaw KJ, et al. Efficacy of delayed therapy with Fosmanogepix (APX001) in a murine model of *Candida auris* invasive candidiasis. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63(11):pii: e01120–19.
- 143. Alkhazraji S, Gebremariam T, Alqarihi A, et al. Fosmanogepix (APX001) is effective in the treatment of immunocompromised mice infected with invasive pulmonary scedosporiosis or disseminated fusariosis. Antimicrob Agents Chemother. 2019 Dec 9. pii: AAC.01735-19.
- 144. Oliver JD, Sibley GEM, Beckmann N, et al. F901318 represents a novel class of antifungal drug that inhibits dihydroorotate dehydrogenase. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016;113:12809–12814.
- 145. Wiederhold NP, Law D, Birch M. Dihydroorotate dehydrogenase inhibitor F901318 has potent in vitro activity against *Scedosporium* species and *Lomentospora prolificans*. J Antimicrob Chemother. 2017;72(7):1977–1980.
- 146. Biswas C, Law D, Birch M, et al. In vitro activity of the novel antifungal compound F901318 against Australian Scedosporium and Lomentospora fungi. Med Mycol. 2018;56(8):1050–1054.
- 147. Nagl M, Arnitz R, Lackner M. N-Chlorotaurine, a promising future candidate for topical therapy of fungal infections. Mycopathologia. 2018;183(1):161–170.
- Ashburn TT, Thor KB. Drug repositioning: identifying and developing new uses for existing drugs. Nat Rev Drug Discov. 2004;3 (8):673–683.
- 149. Wiederhold NP, Patterson TF, Srinivasan A, et al. Repurposing auranofin as an antifungal: *In vitro* activity against a variety of medically important fungi. Virulence. 2017;8(2):138–142.
- Fuchs BB, RajaMuthiah R, Souza AC, et al. Inhibition of bacterial and fungal pathogens by the orphaned drug auranofin. Future Med Chem. 2016;8(2):117–132.

2.3. Conclusion

De nombreuses avancées ont été réalisées ces dernières années concernant la taxonomie et l'écologie des *Scedosporium*. Par ailleurs, la publication du génome de plusieurs espèces de *Scedosporium* et le développement de diverses approches « omiques » ont ouvert de nouvelles perspectives sur les mécanismes qui sous-tendent les interactions hôte-pathogène, notamment grâce au décryptage de certains facteurs de virulence qui constituent de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. D'importants progrès ont également été réalisés dans la prise en charge de ces infections, en particulier *via* l'amélioration du diagnostic biologique, mais aussi la mise en évidence de l'efficacité des associations antifongiques pour le traitement d'une infection due à *Scedosporium*. Cependant, il reste encore beaucoup à faire dans le domaine de la prévention, du diagnostic et de la prise en charge thérapeutique de ces infections.

La question élémentaire mais cruciale pour laquelle nous n'avons toujours pas de réponse est : « pourquoi la colonisation respiratoire par *Scedosporium* est-elle si fréquente dans la mucoviscidose ? ». En effet, à la différence d'autres moisissures omniprésentes dans l'environnement (*e.g. A. fumigatus*), il existe un contraste saisissant entre la très faible quantité de spores de *Scedosporium* retrouvées dans l'air ambiant et la forte proportion de patients colonisés de façon chronique (~ 10%). Il est impossible de répondre à cette question sans considérer les propriétés intrinsèques du mucus s'accumulant à la surface des cellules épithéliales (acidose, hypoxie, hypercapnie...). Plusieurs données expérimentales convergent en faveur d'une hyper-adaptabilité de *Scedosporium* à ce micro-environnement si particulier.

Une autre question restée en suspens concerne la tolérance à la colonisation. En effet, malgré la description d'infections respiratoires et de mycoses bronchopulmonaires allergiques, l'expression clinique d'une colonisation chronique par *Scedosporium* spp. est habituellement modérée voire nulle, alors que ces champignons sont de redoutables pathogènes sur d'autres terrains (*e.g.* immunosuppression). A nouveau, des études devraient être menées sur l'influence de la composition du mucus CF sur le métabolisme fongique. Plus précisément, il est possible de spéculer sur le rôle du mucus bronchique dans la réduction de l'expression de certains caractères pathogènes du champignon, comme la production de métabolites secondaires, pour éviter l'exacerbation de la réponse immunitaire.

Le métabolisme secondaire des *Scedosporium*, et d'une manière plus large des champignons pathogènes, est abordé dans la section suivante, avec un focus sur la production de peptides non-ribosomiques, en particulier les sidérophores.

3. Synthèse peptidique non-ribosomique

3.1. Introduction

Les champignons microscopiques, tout comme les bactéries, sont capables de coloniser les milieux aquatiques ou terrestres, mais également d'autres êtres vivants. Pour ce faire, ils doivent optimiser les interactions avec leur environnement et développer des stratégies d'attaque et de défense contre les espèces concurrentes car les ressources sont limitées. Dans cette optique, les champignons produisent de nombreuses molécules de faible poids moléculaire appelées métabolites secondaires. A la différence des métabolites primaires, essentiels à la croissance et au développement cellulaire et impliqués dans des processus métaboliques plus ou moins conservés au sein du règne du vivant, les métabolites secondaires sont propres à chaque espèce et ne seront synthétisés que pour aider à la survie de l'individu dans un écosystème donné [180]. Grâce à ces composés, les microorganismes pourront ainsi : (i) perfectionner leur capacité à absorber les nutriments (e.g. le fer) et sources d'énergie disponibles ; (ii) se protéger contre les rayonnements ionisants et les radicaux oxygénés, par exemple en produisant des pigments ; ou encore (iii) neutraliser les microorganismes rivaux par la production d'agents antimicrobiens et se protéger contre les attaques des autres espèces, voire même de l'organisme hôte. De par la grande diversité de leur structure chimique, les peptides non-ribosomiques (NRPs : Non Ribosomal Peptides) ont la particularité de couvrir l'ensemble des stratégies énoncées précédemment. Ce large éventail de structure chimique est dû à un mode de synthèse original ne faisant pas intervenir les ribosomes. Leur biosynthèse est assurée par des complexes multi-enzymatiques centrés chacun sur une enzyme appelée « Non Ribosomal Peptide Synthetases » (NRPSs) dont nous allons détailler la structure et le mode de fonctionnement.

3.2. Le mécanisme NRPS

3.2.1. Historique

La découverte de la voie NRPS remonte aux années 1960. A cette époque, des chercheurs américains et japonais ont observé que la synthèse de deux décapeptides antibiotiques, la tyrocidine et la gramicidine S, naturellement produits par *Bacillus brevis* restait possible malgré le traitement des extraits cellulaires à la RNAse ou par des inhibiteurs de la synthèse ribosomique [181–183]. Les auteurs en déduirent que la biosynthèse de ces peptides s'effectuait indépendamment du système ribosomique *via* une ou plusieurs protéines déjà existantes. Par la suite, ils découvrirent chez cette bactérie la présence d'enzymes de grande taille dont la fonction n'avait pas encore été décrite. En 1971, Lipmann *et al.* [184] réussirent à les isoler et montrèrent qu'elles étaient bien impliquées dans la production de la tyrocidine et de la gramicidine S. Ces enzymes font désormais partie de la vaste famille des NRPSs.

3.2.2. NRPSs : vue d'ensemble

Les NRPSs sont des machineries cellulaires organisées en complexes macromoléculaires subdivisés en modules. Chaque module est constitué de plusieurs unités enzymatiques appelées domaines, et dont l'action combinée permet l'assemblage de peptides non-ribosomiques (Figure 17).



Synthétase peptidique non-ribosomique (NRPS)

Figure 17. Représentation schématique d'une NRPS avec les domaines de base pour l'initiation, l'élongation et la terminaison de l'assemblage peptidique.

A, domaine d'adénylation ; T, domaine de thiolation ; C, domaine de condensation ; Te, domaine thioestérase ; aa, acide aminé

La présence de gènes impliqués dans la synthèse de peptides non-ribosomiques (NRPs) a été décrite chez une grande variété de taxons. La majorité des NRPs caractérisés sont issus de bactéries ou de champignons filamenteux [185]. Néanmoins, la voie de synthèse non-ribosomique a également été décrite chez les cyanobactéries [186] et les archaebactéries [187]. A ce jour, la synthèse de ferrichrome par *Schizosaccharomyces pombe* est le seul exemple de synthèse non-ribosomique observée chez une levure [188]. En revanche, aucune production avérée de peptides non-ribosomiques n'a été documentée chez les organismes eucaryotes appartenant aux clades *Metazoa* et *Plantae*.

Contrairement aux gènes du métabolisme primaire, les gènes impliqués dans la biosynthèse d'un même NRP sont très souvent regroupés dans une région restreinte du génome appelée opéron ou cluster, ce qui permet une régulation coordonnée. La NRPS peut être produite soit à partir d'un unique gène comme c'est le cas pour la ferrichrome synthétase de *S. pombe*, soit à partir de plusieurs gènes comme par exemple la tyrocidine synthétase de *B. brevis*. Dans ce dernier cas, le NRP synthétisé résulte de l'activité d'une NRPS composée de plusieurs protéines. La taille du gène codant la NRPS peut dépasser les 10 kilobases selon le nombre de modules constituant la synthétase. En plus des gènes codant la NRPS, d'autres gènes impliqués dans la production du NRP sont présents au sein du cluster/opéron. Les produits de ces gènes correspondent habituellement à des régulateurs (facteurs de transcription), mais aussi à des transporteurs, à des enzymes concourant à la synthèse de précurseurs de NRP, ou encore à des enzymes « de décoration » modifiant le NRP néo-synthétisé. En cas de toxicité du NRP, des gènes conférant à l'organisme producteur une résistance vis-à-vis du peptide produit peuvent être présents au sein du cluster/opéron [189].

Les synthétases peptidiques non-ribosomiques sont produites selon la voie classique de synthèse des protéines [190]. Ainsi, les gènes codant les NRPSs sont transcrits dans un premier temps en ARNm par une ARN polymérase. La séquence nucléotidique de l'ARNm est ensuite traduite en séquence protéique par les ribosomes, puis la protéine subit un processus de maturation lui permettant d'acquérir sa structure tertiaire. La NRPS adopte ainsi une structure modulaire, constituée de plusieurs domaines enzymatiques requis pour l'assemblage du peptide non-ribosomique.

3.2.3. Structure et organisation des domaines enzymatiques

Comme mentionné ci-avant, les NRPSs sont constituées de modules eux-mêmes composés de domaines à activité enzymatique. Ces domaines sont identifiables grâce à l'existence de courtes séquences d'acides aminés, appelées signatures, qui sont hautement conservées d'une NRPS à l'autre et d'un organisme à l'autre. Chaque domaine possède ses signatures caractéristiques (Tableau 2). Cette spécificité est notamment mise à profit par les logiciels bioinformatiques (*e.g.* antiSMASH) pour prédire l'organisation structurale d'une NRPS donnée [191].

Domaine	Motif	Séquence signature	Domaine	Motif	Séquence signature
Adénylation	A1	L(TS)YxEL	Épimérisation	E1	PIQxWF
	A2	LKAGxAYL(VL)P(LI)D		E2	HHxISDG(WV)S
	A3	LAYxxYTSG(ST)TGxPKG		E3	DxLLxAxG
	A4	FDxS		E4	EGHGRE
	A5	NxYGPTE		E5	RTVGWFTxxYP(YV)PFE
	A6	GELxJGx(VL)ARGYL		E6	PxxGxGYG
	A7	Y(RK)TGDL		E7	FNYLG(QR)
	A8	GRxPxQVKIRGxRIELGEIE	Méthylation	M1	VL(DE)xGxGxG
	A9	LPxYM(IV)P		M2	NELSXYRYXAV
	A10	NGK(VL)DR		M3	VExSxARQxGxLD
Thiolation	Т	LGG(DH)SL	Thioestérase	Те	GxSxG
Condensation	C1	SxAQxR(LM)(WY)xL	Cyclisation	Cy1	FPL(TS)xxQxAYxxGR
	C2	RHExLRTxF		Cy2	RHx(IM)L(PAL)x(ND)GxQ
	C3	MHHxISDG(WV)S		Cy3	LPxxPxLPLxxxP
	C4	YxD(FY)AVW		Cy4	(TS)(PA)3x(LAF)6x(IVT)LxxW
	C5	(IV)GxFVNT(QL)(CA)xR		Cy5	(GA)DFTxLxLL
	C6	(HN)QD(YD)PFE		Cy6	PVVFTSxL
	C7	RDxSRNPL		Cy7	(ST)(QR)TPQVx(LI)D13xWD
Réduction	R1	V(L)(L)TG(A)TG(F)(L)GxxLL	Oxydation	Ox1	KYxYxSxGxxY(PG)VQ
	R2	Vx(L)(L)VR(A)		Ox2	GxxxG(LV)xxGxYYY(HD)P
	R3	GPL(G)x(P)x(L)GL		Ox3	IxxxYG
	R4	V(Y)PYxYLxx(P)NVxxT			
	R5	GYxxSKW(A)(A)E			
	R6	R(P)G			
	R7	YxxxxG(LF)LxxP			

Tableau 2. Séquences signatures caractéristiques des principaux domaines impliqués dans la synthèse peptidique non-ribosomique, d'après Schwarzer *et al.* [192].

Les domaines de NRPSs peuvent être classés en 2 catégories : les domaines principaux (indispensables au fonctionnement de la synthétase) et les domaines secondaires (domaines « facultatifs »). Les domaines d'adénylation, de thiolation, de condensation et de thioestérase, essentiels pour l'assemblage et la libération du peptide, constituent les domaines principaux. Les domaines secondaires interviennent dans la modification des monomères incorporés au cours de la synthèse non-ribosomique. Ils incluent notamment les domaines de méthylation, d'oxydation, d'épimérisation, et de cyclisation [192].

a) Les domaines principaux

Le domaine d'adénylation (A)

Les domaines d'adénylation (A) jouent un rôle crucial dans la synthèse non-ribosomique puisqu'ils sont chargés de reconnaître et d'activer les monomères à incorporer dans le peptide. Il s'agit de domaines très conservés au sein de la famille des NRPSs ; à ce titre, ils comprennent 10 motifs notés A1 à A10 présentant un enchaînement d'acides aminés requis pour le bon fonctionnement du domaine (Tableau 2). Les domaines A sont composés en moyenne de 550 acides aminés. Ils appartiennent à la superfamille des enzymes formant les adénylates. Ainsi, le monomère sélectionné réagit avec une molécule d'ATP en présence d'ions Mg²⁺ pour donner un aminoacyl-adénylate (forme activée du monomère) et un pyrophosphate (Figure 18).



Figure 18. Réaction d'activation d'un acide aminé sélectionné par un domaine A, d'après Kasai et al. [193].

Les domaines A sont organisés en deux sous-domaines : l'un plus long du côté N-terminal, nommé A_{core} (~ 450 acides aminés), où se situe le site actif, et l'autre beaucoup plus court du côté C-terminal, nommé A_{sub} (~ 100 acides aminés). Le sous-domaine A_{sub} est très mobile entre les différents états fonctionnels du domaine A. Le cycle « ouverture-fermeture » a été élucidé *via* un important travail structural réalisé par plusieurs équipes [194–196] puis assemblé par Yonus *et al.* [197] (Figure 19). Dans un premier temps, une conformation «ouverte» du sous-domaine A_{sub} permet la liaison des acides aminés, de l'ATP et du Mg²⁺, après quoi le sous-domaine A_{sub} se ferme avec une rotation de ~ 30° permettant ainsi de générer l'intermédiaire aminoacyl-adénylate. Après la libération du groupement pyrophosphate, le sous-domaine A_{sub} effectue une rotation de ~ 140° ce qui autorise le transfert du monomère activé sur le domaine suivant (domaine de thiolation).





Le sous-domaine A_{sub} est représenté en bleu. Le sous-domaine A_{core} est constitué de trois sous-régions colorées en rouge, jaune et vert. L'extrémité C-terminale est indiquée par une sphère rouge. Dans sa conformation ouverte, le domaine A peut accueillir le substrat, l'ATP et le Mg^{2+} . La fixation de l'ATP entraîne une rotation du sous-domaine A_{sub} d'environ 30°, facilitant son rapprochement avec le sous-domaine A_{core} qui porte l'activité catalytique. La libération du pyrophosphate induit une rotation du sous-domaine A_{sub} d'environ 140°, ce qui permet le rapprochement du domaine de thiolation adjacent (représenté en gris). En pointillés, l'interaction entre la partie C-terminale du domaine A et l'extrémité N-terminale du domaine de thiolation (sphère bleue).

Bien que certains domaines d'adénylation soient capables d'activer plusieurs monomères distincts [198], ces domaines possèdent en général une spécificité élevée pour un monomère particulier [192,199]. C'est donc la spécificité des domaines A et leur disposition le long de la chaîne d'assemblage qui détermine la structure de base du NRP (celui-ci pouvant être modifié en cours de synthèse par des domaines secondaires). L'obtention de la structure cristallisée du domaine A activant la phénylalanine (PheA) durant la synthèse de la gramicidine S chez B. brevis a largement contribué à la compréhension du mode de fonctionnement de ces domaines. En 1997, Conti et collaborateurs [194] décrivirent le site actif (« binding pocket ») de PheA, composé de 10 acides aminés impliqués dans la reconnaissance, le recrutement et l'activation du substrat (Figure 20). Ces 10 acides aminés se situent dans un rayon d'environ 5,5 Å autour du site de fixation du substrat. Ils forment un code conférant la spécificité des domaines A, appelé « Selectivity-Conferring Code » ou « Code Stachelhaus » du nom de son inventeur, ou encore « Code NRPS » (Tableau 3). C'est en quelque sorte l'équivalent non-ribosomique du code génétique. Tout comme ce dernier, le code NRPS peut être qualifié de « dégénéré » : un même acide aminé peut être sélectionné via des séquences signature distinctes. Par exemple, il existe au moins 4 signatures différentes capables d'activer une leucine, 3 pour la valine et la tyrosine, ou encore 2 pour la cystéine. Ce code est intégré dans plusieurs programmes d'annotation des NRPSs pour prédire le type de monomère sélectionné.



Figure 20. Représentation spatiale du site d'activation de la phénylalanine par PheA, d'après Conti *et al.* [194]. La poche de fixation spécifique de la phénylalanine (en vert) est constituée de 10 acides aminés. Les résidus Asp235 et Lys517 sont cruciaux pour l'établissement de liaisons électrostatiques avec les groupes amino et carboxyle de la phénylalanine (pointillés). La spécificité des chaînes latérales constituant la poche est conférée d'un côté par Ala236, Ile330 et Cys331 (ici, caché par le substrat), et de l'autre par Thr278, Ile299, Ala301 et Ala322. Les deux chaînes sont séparées par le noyau indole du Trp239 présent en bas de la poche, ce qui autorise le recrutement des isomères L-Phe et D-Phe sans modification conformationnelle.

Deux acides aminés cruciaux pour la sélection du substrat sont quasiment invariables : la lysine en position 517, responsable de la stabilisation du groupement carboxylate, et l'acide aspartique en position 235, impliqué dans la fixation du groupe amino (Tableau 3). Une modification du résidu Asp235 intervient uniquement lorsque le monomère à activer est un acide carboxylique (*e.g.* acide δ (L- α -amino-adipique), acide 2,3-dihydroxy benzoïque, acide salicylique). Les positions 236, 301 et 330 correspondent dans 93% des cas à des résidus hydrophobes, et varient relativement peu. A l'inverse, les cinq derniers acides aminés constituant la poche de fixation - en particulier les positions 278 et 299 - sont beaucoup plus variables. Ceux-ci jouent un rôle majeur dans la distinction des chaînes latérales des différents substrats.

En 2003, Schwarzer *et al.* [192] ont élargi la liste des motifs conservés aux autres domaines formant les NRPSs (Tableau 2). Ils ont également montré que 9 acides aminés parmi les 10 formant le site actif de PheA sont localisés entre les motifs A4 et A5, tandis que le dixième résidu (Lys517) se trouve en dehors de cette région.

Deux ans plus tard, Rausch *et al.* [200] ont décrit une nouvelle méthode de prédiction basée sur un ensemble de 34 acides aminés « signatures » (comprenant les 10 résidus du code Stachelhaus) localisés à moins de 8 Å du site de fixation du substrat. Selon les auteurs, cette méthode permettait d'assigner une spécificité pour 18% de domaines A supplémentaires par rapport au modèle Stachelhaus. Par la suite, d'autres outils ont été développés pour tenter d'affiner la prédiction du monomère sélectionné ; néanmoins, ils reposent tous sur le fait que la spécificité du domaine A dépend de la composition en acides aminés présents à certaines positions du site actif.

Tableau 3. Le code conférant	la spécificité des doma	ines A, d'après Stache	lhaus <i>et al.</i> [199].

Monomère					Pos	ition					Machinerie biosynthétique
	235	236	239	278	299	301	322	330	331	517	-
Aad	Е	Р	R	N	Ι	V	Е	F	V	K	ΑςνΑ
Ala	D	L	L	F	G	Ι	Α	V	L	Κ	CssA, Hts1
Asn	D	L	Т	K	L	G	E	V	G	Κ	BacA, CepA, Dae, Glg1, TycC
Asp	D	L	Т	К	V	G	Н	Ι	G	K	BacC, SrfAB, LicB, LchAB
Cys(1)	D	Н	Е	S	D	V	G	Ι	Т	Κ	AcvA
Cys(2)	D	L	Y	Ν	L	S	L	Ι	W	K	BacA, HMWP2
Dab	D	L	Е	Н	Ν	Т	Т	V	S	K	SyrE
Dhb/Sal	Р	L	Р	Α	Q	G	V	V	Ν	K	EntE, DhbE, MbtA, PchD, VibE, YbtE
Gln	D	А	Q	D	L	G	V	V	D	К	LicA, LchAA
Glu(1)	D	А	W	Н	F	G	G	V	D	К	FenA, FenC, FenE, PPS1, PPS3, PPS4
Glu(2)	D	А	К	D	L	G	V	V	D	К	BacC, SrfAA
Ile(1)	D	G	F	F	L	G	V	V	Y	К	BacA, BacC, LicC, LchAC
Ile(2)	D	А	F	F	Y	G	Ι	Т	F	К	FenB, PPS5
Leu(1)	D	А	W	F	L	G	Ν	V	V	К	BacA, LicA, LchAA, LicB, LchAB, SrfAA, SrfAB
Leu(2)	D	А	W	L	Y	G	А	V	М	К	CssA
Leu(3)	D	G	Α	Y	Т	G	Е	V	V	К	GrsB, TycC
Leu(4)	D	А	F	М	L	G	М	V	F	К	LicA, LchAA, SrfAA
Orn(1)	D	Μ	Е	Ν	L	G	L	Ι	Ν	Κ	FxbC
Orn(2)	D	V	G	Е	Ι	G	S	Ι	D	К	BacB, FenC, GrsB, PPS1, TycC
Phe	D	А	W	Т	I	А	Α	V	С	К	GrsA, SnbDE, TycA, TycB
Phe/hPhg	D	Ι	F	L	L	G	L	L	С	К	CepB, CepC, SnbDE
Pip/Pip*	D	F	Q	L	L	G	V	А	V	К	FkbP, RapP, SnbA, SnbDE
Pro	D	V	Q	L	Ι	А	Н	V	V	К	GrsB, FenA, PPS4, SnbDE, TycB
Ser	D	V	W	Н	L	S	L	Ι	D	К	EntF, SyrE
Thr/Dht	D	F	W	Ν	Ι	G	М	V	Н	Κ	AcmB, Fxb, PPS2, PyoD, SnbC, SyrB, SyrE
Tyr(1)	D	G	Т	Ι	Т	А	Е	V	А	К	FenA, PPS2, PPS4
Tyr(2)	D	А	L	V	Т	G	Α	V	V	К	ТусВ, ТусС
Tyr(3)	D	А	S	Т	V	А	А	V	С	К	BacC, CepA, CepB
Val(1)	D	А	F	W	Ι	G	G	Т	F	К	GrsB, FenE, LicB, LchAB, PPS3, SrfAB, TycC
Val(2)	D	F	Е	S	Т	А	А	V	Y	К	AcvA
Val(3)	D	Α	W	М	F	А	А	۷	L	Κ	CssA
Variabilité	3%	16%	16%	39%	52%	13%	26%	23%	26%	0%	

Les séquences signature ont été déterminées à partir des domaines activant le même substrat. Les résidus variables sont indiqués en rouge ; les positions hyper-variables définies par une variabilité \geq 36% parmi l'ensemble des résidus identifiés pour une position donnée, sont indiquées en bleu. La colonne 'machinerie biosynthétique' désigne les NRPSs dont au moins un domaine d'adénylation est capable d'activer le monomère mentionné en début de ligne. Aad, acide δ (L-a-amino-adipique) ; Dab, acide 2,3-diamino butyrique ; Dhb, acide 2,3-dihydroxy benzoïque ; Sal, salicylate ; Phg, L-phenylglycine ; hPhg, 4-hydroxy-L-phenylglycine ; Pip, acide L-pipécolinique ; Dht, déhydrothréonine ; le sigle * indique une modification du résidu.

Le domaine de thiolation (T)

Les domaines de thiolation, également retrouvés dans la littérature sous le terme PCP pour « Peptidyl Carrier Protein », sont de courts domaines composés d'environ 80-100 acides aminés [190]. Ils représentent l'unité de transport permettant aux monomères de se déplacer le long de la chaîne catalytique. La fixation du monomère activé (aminoacyl adénylate) sur le domaine T se fait au niveau d'un bras phosphopantéthéine (PPant) terminé par un groupement thiol, ce dernier permettant la formation d'une liaison covalente de type thioester (Figure 21). L'intermédiaire aminoacyl-PCP ainsi formé possède une grande flexibilité vis-à-vis des autres domaines de la NRPS [201]. A noter que les domaines T ne présentent pas d'activité enzymatique, la réaction de thiolation étant catalysée par les domaines d'adenylation. En outre, à la différence des domaines A, aucune région correspondant à une poche de fixation du substrat n'a pu être identifiée au sein des domaines T. Il est donc possible que ces domaines ne présentent pas de spécificité particulière pour les substrats fixés [189].

La phosphopantéthéinylation des domaines T, qui entraîne la conversion de la forme inactive (apo-PCP) en forme active (holo-PCP), est une modification post-traductionnelle réalisée sous l'action d'une phosphopantéthéine transférase (PPTase). Cette enzyme catalyse l'ajout d'un fragment 4'-phosphopantéthéine provenant du coenzyme A, sur une sérine du domaine T. La sérine servant de point d'amarrage est un acide aminé conservé chez toutes les NRPSs et qui s'intègre dans la signature du domaine T (séquence : LGG(DH)**S**L) (Tableau 2).



Figure 21. Fixation d'un monomère activé sur le bras PPant d'un domaine T, d'après Kasai et al. [193].

Le domaine de condensation (C)

Les domaines de condensation, composés en moyenne de 450 acides aminés, sont chargés d'établir la liaison peptidique entre deux monomères activés par les domaines A de deux modules successifs (ou par un même domaine A fonctionnant de manière itérative). Lors de cette étape, la liaison thioester du substrat situé en amont subit une attaque nucléophile par le groupe amino de l'aminoacyl-PCP situé en aval, entraînant la formation d'une liaison peptidique, et par la même occasion, le transfert du peptide ou de l'acide aminé en amont sur l'aminoacyl-PCP en aval et donc l'extension de la chaîne peptidique (Figure 22). A ce titre, les domaines C sont organisés en deux sous-domaines chargés d'accueillir les substrats à relier. Ces sous-domaines possèdent, comme les domaines A, une certaine spécificité de substrat. Cette spécificité est plus prononcée pour le sous-domaine situé du côté C-terminal - fixant le monomère « accepteur » du monomère ou de la chaîne peptidique en amont - ce qui maintient la direction de la chaîne peptidique en cours d'élongation [202]. Plusieurs études ont démontré que la sélectivité du site accepteur porte à la fois sur la stéréochimie

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez *Scedosporium apiospermum*, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose
(isomère L ou D) et sur la nature de la chaîne latérale du monomère à intégrer [202–205]. Ainsi, les domaines C constituent, en plus des domaines A, un second verrou pour la sélection des substrats à incorporer [202,206].





Le domaine C comprend un site « accepteur » (a) qui accueille le monomère fixé au domaine T (ici noté PCP) du module analogue, et un site « donneur » (d) qui héberge le monomère fixé au domaine T du module précédent. La liaison peptidique est générée suite à l'attaque nucléophile du monomère fixé au site « donneur » par le monomère fixé au site « accepteur ». Le dipeptide ainsi formé peut alors basculer vers le site « donneur » du domaine C suivant.

Les domaines de condensation sont composés de 7 séquences signatures notées de C1 à C7. Chaque séquence contient un ou plusieurs résidus importants pour la structure, le repliement, ou encore l'activité catalytique du domaine [207]. Le site catalytique est caractérisé par la présence de la séquence signature C3 (MHHxISDG[WV]S) [208] ; plus précisément, le second résidu histidyl ainsi que le résidu glycyl ont été identifiés comme cruciaux pour le maintien de l'activité catalytique des domaines C [209].

Des études phylogénétiques ont permis de révéler plusieurs types de domaines C classés en fonction de leurs activités spécifiques [207,210]. On distingue ainsi :

- le domaine ^LC_L impliqué dans la formation d'une liaison peptidique entre deux acides aminés
 L ;
- le domaine ^DC_L impliqué dans la formation d'une liaison peptidique entre un acide aminé L et un acide aminé D. Ce domaine est retrouvé à la suite d'un domaine d'épimérisation (la fonction de ce domaine sera décrite dans la partie traitant des domaines secondaires);
- le domaine dual E/C (épimérisation/condensation) découvert suite à la mise en évidence de NRPs contenant des acides aminés sous forme D alors que la synthétase ne possède pas de domaine d'épimérisation. Ainsi, ce domaine est capable de réaliser non seulement l'épimérisation du monomère L activé par le module précédent, mais aussi la formation de la liaison peptidique avec l'aminoacyl-PCP (isomère L) situé en aval ;
- et le domaine **C-starter** chargé d'assurer la liaison peptidique entre un acide bêta-hydroxylé et un acide aminé sélectionné par le premier domaine d'adénylation. Ce type de domaine est situé dans la partie N-terminale de certaines NRPSs, en amont du module d'initiation, d'où son nom. Il permet de générer des composés de type lipopeptides ou depsipeptides.

Le domaine thioestérase (Te)

Les domaines thioestérases sont habituellement localisés à l'extrémité C-terminale du module de terminaison de la synthétase (Figure 17). Ils sont composés d'environ 280 acides aminés permettant le clivage de la liaison entre le peptide néo-synthétisé et le domaine de thiolation du dernier module auquel il est appendu. Les domaines Te sont apparentés à la famille des a/β hydrolases, dont l'activité repose sur une triade catalytique formée de trois résidus : séryl, histidyl et aspartyl [210]. Dans un premier temps, le groupement peptidyl est transféré sur la sérine du site catalytique, formant un intermédiaire peptidyl-O-Te. Le domaine Te catalyse ensuite la réaction d'hydrolyse permettant la libération d'un peptide linéaire. Parfois, la libération du peptide sous l'action du domaine Te s'accompagne d'une réaction de cyclisation (totale ou partielle), ce qui augmente la stabilité de l'édifice (Figure 23).

Ces domaines sont surtout l'apanage des NRPSs bactériennes. Chez les champignons, le domaine thioestérase est souvent absent et se trouve remplacé par un domaine de condensation terminal (C_T). Ce dernier est notamment rencontré au sein de NRPSs assurant la synthèse de sidérophores fongiques. Bien que la finalité soit la même, le domaine Te et le domaine C_T possèdent une architecture et un mécanisme d'action très différents. Dans le cas du domaine Te, le peptide est préalablement fixé à la sérine du site actif avant d'être clivé. A l'inverse, le peptide n'est pas lié de façon covalente au domaine C_T , comme c'est le cas pour les domaines de condensation « classiques ». L'histidine de la poche catalytique déprotone directement le groupe amino du peptide porté par le domaine de thiolation précédent, favorisant l'attaque nucléophile intramoléculaire et ainsi le mécanisme de cyclisation [211].





b) Les domaines secondaires

A côté des domaines principaux qui sont indispensables à la synthèse peptidique non-ribosomique, il existe des domaines secondaires responsables de modifications des monomères du NRP au cours de son assemblage. Ces modifications chimiques apportent une rigidité structurale et améliorent la stabilité, conduisant à la protection du peptide vis-à-vis de la protéolyse [210].

Le domaine d'épimérisation (E)

Les domaines d'épimérisation présentent des similitudes importantes avec les domaines de condensation. Outre leur taille (~ 450 acides aminés), ces domaines possèdent le même résidu histidyl conservé au sein du site catalytique. Leur rôle consiste à convertir des monomères recrutés sous forme L, en leur énantiomère de forme D. En règle générale, l'épimérisation intervient avant la condensation de deux monomères activés par deux modules adjacents. Ceci est particulièrement vrai lorsque le domaine E se situe dans un module d'initiation. L'épimérisation peut également survenir après la condensation ; dans ce cas, la réaction est catalysée de préférence sur l'intermédiaire peptidyl-Ppant plutôt que sur l'aminoacyl-Ppant. L'intégration d'un acide aminé sous forme D permet parfois au peptide d'adopter une conformation propice à son activité biologique [213].

Le domaine de cyclisation (Cy)

Les domaines de cyclisation présentent une forte homologie de séquence et de structure avec les domaines de condensation auxquels ils peuvent parfois se substituer. Ils sont impliqués dans la formation d'un hétérocycle (ex : thiazoline, oxazoline) obtenu par cyclodéshydratation d'un résidu cystéinyl, séryl ou thréonyl [210]. Ces domaines permettent d'augmenter la diversité structurale ainsi que la rigidité des peptides néo-formés. Ils sont également très importants pour l'activité biologique des NRPs, en particulier la chélation des métaux et les interactions avec les protéines et les acides nucléiques. C'est par exemple le cas pour des antibiotiques comme la bacitracine [214], des anti-tumoraux comme la bléomycine [215], ou encore des sidérophores comme la yersiniabactine [216].

Les domaines d'oxydation (Ox) et de réduction (R)

L'état d'oxydation des hétérocycles générés par les domaines Cy peut être modifié *via* l'intervention des domaines d'oxydation ou de réduction.

Le domaine Ox est impliqué dans la conversion des cycles thiazolines et oxazolines en cycles thiazoles et oxazoles, en utilisant la flavine mononucléotide (FMN) comme coenzyme [217]. La localisation de ce domaine est variable selon les NRPSs : dans le cas de la synthétase de l'épothilone, le domaine Ox est intégré directement dans le domaine A, formant un module « Cy-A-Ox-A-T », tandis qu'il est situé juste après le domaine T pour la synthétase de la bléomycine [218].

Le domaine R catalyse essentiellement la réduction des résidus thiazoline et oxazoline en thiazolidine et oxazolidine, respectivement. Il utilise le NADPH comme cofacteur. Ce domaine peu fréquent au sein des NRPSs est retrouvé dans des synthétases de sidérophores bactériens tels que la yersiniabactine et la pyochéline [190]. A noter que chez certains champignons du genre *Trichoderma*, le domaine R peut se substituer au domaine thioestérase catalysant la réduction de l'acyl-thioester en son alcool primaire [219]. Ces domaines R « terminaux » permettent la libération de peptaibols, qui sont des NRPs porteurs d'un groupement alcool en C-terminal.

Le domaine de méthylation (M)

Ces domaines composés d'environ 420 acides aminés catalysent la méthylation du monomère sélectionné au cours de l'assemblage du NRP. Cette réaction peut se produire avant ou après la formation de la liaison peptidique par le domaine de condensation [201]. Elle fait intervenir le coenzyme S-adenosyl méthionine (SAM) en tant que donneur de groupement méthyle. Habituellement, les domaines M ne sont pas situés entre deux domaines distincts, mais sont plutôt intégrés directement au sein d'un domaine d'adénylation. Deux localisations semblent privilégiées : entre les motifs A2 et A3 ou entre les motifs A8 et A9 [220].

Les domaines de méthylation sont surtout rencontrés dans les NRPSs fongiques. L'exemple le plus important en médecine humaine est la cyclosporine A, qui intègre 7 acides aminés méthylés parmi les 11 monomères sélectionnés.

Le domaine de formylation (F)

Chez la plupart des NRPSs, le module d'initiation est composé uniquement d'un domaine A et d'un domaine T. Néanmoins, la présence d'un domaine additionnel catalysant la formylation du monomère sélectionné *via* le coenzyme N¹⁰-formyl-tétrahydrofolate (N¹⁰-formyl-THF), a été détectée chez certaines synthétases. C'est par exemple le cas de LgrA, NRPS de la gramicidine linéaire [221]. Le domaine de formylation de LgrA est situé juste devant le domaine A avec lequel il interagit étroitement. En effet, la cristallisation du module d'initiation de LgrA a montré que la partie C-terminale du domaine F étaient quasiment fusionnée avec la partie N-terminale du domaine A, créant une rigidité assez inhabituelle pour une NRPS [222].

3.2.4. Modes de fonctionnement des NRPSs

La structure globale d'une NRPS s'apparente à une chaîne d'assemblage d'acides aminés dans laquelle chaque domaine joue un rôle précis. Les monomères sont d'abord sélectionnés et activés par les domaines d'adénylation, avant d'être transférés sur le bras phosphopanthétéine des domaines de thiolation. Les domaines de condensation sont ensuite chargés d'établir la liaison peptidique entre deux monomères recrutés par deux modules consécutifs (ou par le même domaine A lorsque celui-ci fonctionne de manière itérative). Les domaines secondaires, quant à eux, sont responsables de modifications du NRP au cours de son assemblage. Celles-ci peuvent se produire avant ou après l'action du domaine de condensation. Enfin, le domaine terminal permet la libération (et parfois, la cyclisation) du peptide néo-synthétisé.

Il existe trois grands types de biosynthèse des NRPs, fonction du mode d'assemblage des monomères [223]. La biosynthèse linéaire (type A) est la plus fréquemment observée. Dans ce cas de figure, le nombre et l'ordre des monomères intégrés sont directement liés au nombre et à l'ordre des modules constituant la synthétase. Ainsi dans le mode linéaire, une NRPS est formée d'un module d'initiation (A-T) chargé de recruter le premier monomère, suivi de « n » modules d'élongation (C-A-T) permettant de générer un NRP composé de « n+1 » monomères. La cyclosporine A, la surfactine, ou encore l'ACV (tripeptide précurseur des β -lactamines) sont synthétisés de cette manière (Figure 24).



Figure 24. Biosynthèse linéaire (type A) : exemple de l'ACV, d'après Mootz et al. [223].

L'ACV synthétase est une NRPS composée de 10 domaines organisés en 3 modules. Chaque module active un monomère spécifique (a, b, c) qui sera incorporé dans le même ordre qu'occupe son module recruteur au sein de la NRPS. Le peptide formé sera libéré après cyclisation partielle par le domaine thioestérase (Te). A noter, la présence d'un domaine d'épimérisation (E) chargé de modifier la stéréochimie du monomère appendu au module 3.

Le deuxième mode de fonctionnement rencontré chez les NRPSs est celui de la synthèse itérative (type B). Ce mode de synthèse suppose qu'un ou plusieurs modules de la synthétase peuvent être utilisés plusieurs fois avant d'aboutir au peptide final. Ainsi, à la différence de la synthèse linéaire, le nombre de monomères composant le NRP n'est pas corrélé au nombre de modules constituant la NRPS. C'est le cas par exemple de l'entérobactine synthétase dont les deux modules doivent réaliser trois cycles successifs pour aboutir à un sidérophore de type hexapeptide [216] (Figure 25). Le terme de synthèse itérative ne s'applique pas uniquement aux NRPS dont l'itération d'un module entier est nécessaire pour la génération du peptide souhaité, mais également lorsque l'un des domaines de la synthétase est le seul à fonctionner de manière itérative. C'est le cas de certaines NRPSs de sidérophores fongiques. Par exemple, la ferrichrome synthétase de *S. pombe* s'organise en deux fractions possédant chacune une structure de type A-T-C-T-C [224]. Chacun des 2 domaines d'adénylation fonctionnels permet d'embarquer de façon itérative le même monomère – une glycine ou un résidu L-AHO (L- N^5 -acétyl- N^5 -hydroxy-ornithine), respectivement – sur trois domaines de thiolation distincts. Les domaines de condensation catalysent ensuite la formation des liaisons peptidiques, aboutissant à la formation d'un hexapeptide libéré après cyclisation par le domaine de condensation terminal (C_T).



Figure 25. Biosynthèse itérative (type B) : exemple de l'entérobactine, d'après Mootz *et al.* [223]. L'opéron de synthèse de l'entérobactine code trois protéines (EntE, EntB et EntF) regroupées en 2 modules. Le premier module fixe un résidu 2,3-dihydroxybenzoate (a) tandis que le second module recrute une L-sérine (b). Le fonctionnement itératif de ces 2 modules permet de générer trois fois le même dipeptide (a+b) dont l'assemblage aboutit à la formation de l'entérobactine, un cyclohexapeptide utilisé comme sidérophore par Escherichia coli. Un troisième mode de fonctionnement encore plus atypique consiste en une synthèse dite « non linéaire » (type C). Celle-ci concerne des synthétases dont l'organisation ne suit pas l'architecture (C-A-T)_n classiquement retrouvée dans les modules d'élongation des NRPSs. A la différence de la biosynthèse linéaire, cette voie peut conduire à des cyclisations internes ou à des branchements dans le peptide final [223]. Elle permet également d'intégrer des petites molécules solubles telles que des polyamines, comme c'est le cas pour la bléomycine ou la vibriobactine. Ces composés ne peuvent pas être incorporés selon le schéma classique puisqu'ils sont dénués de groupement carboxyle nécessaire à leur attachement au groupement Ppant sous forme de thioester. Ainsi, les NRPSs non-linéaires sont dotées de domaines de condensation spécialisés dans le recrutement direct (*i.e.* sans fixation préalable sur un domaine T) de ces composés nucléophiles au niveau du site « accepteur ». La vibriobactine, un sidérophore produit par *Vibrio cholerae*, est un exemple de NRP présentant toutes les caractéristiques du mode de synthèse non-linéaire (Figure 26).



Figure 26. Biosynthèse non-linéaire (type C) : exemple de la vibriobactine, d'après Mootz et al. [223].

La vibriobactine synthétase est constituée de quatre protéines (VibE, VibB, VibH et VibF) dont les trois premières correspondent à des domaines isolés (respectivement : A, T et C). Cette NRPS permet la production d'un sidérophore de type catécholate à partir de trois résidus Dhb (2,3-dihydroxybenzoate) (a), de deux thréonines (b), et d'une triamine (norspermidine) (c). Le domaine de condensation VibH établit la liaison peptidique entre le premier résidu Dhb (a) et un des deux groupements amine primaire de la norspermidine (c). L'enzyme VibF catalyse ensuite l'acylation de l'amine secondaire et de l'amine primaire restante avec un composé dihydroxylphényl-oxazolinecarbonyle (a+b), lui-même issu de la condensation/cyclisation d'un résidu DHB avec une thréonine (b).

Toutefois, la variété des modes de fonctionnement des NRPSs ne se limite pas aux 3 mécanismes sus-cités ; aussi, est-il difficile d'établir des règles applicables à toutes les synthétases. Certaines NRPSs possèdent même un mécanisme de fonctionnement unique. C'est le cas de la synthétase de l'amonabactine, un sidérophore produit par certaines bactéries du genre *Aeromonas* [225]. Cette NRPS présente la particularité d'agir de manière itérative, alternative et optionnelle [198] (Figure 27). Le comportement alternatif provient du domaine d'adénylation AmoG qui sélectionne soit Phe soit Trp, sur lequel se branchent deux dipeptides (Dhb-Lys) générés par les domaines AmoE et AmoF (fonctionnement itératif à 2 cycles de synthèse). Le caractère optionnel, quant à lui, est porté par le domaine AmoH qui provoque, dans deux cas sur quatre, l'insertion d'une Gly entre les résidus Dhb et Lys du dipeptide cité précédemment. Au final, cette NRPS est capable de produire non pas un, mais quatre peptides distincts. La diversité des NRPs générés augmente également avec le nombre de modules et la « permissivité » des domaines d'adénylation constituant la NRPS. Par exemple, il a été montré que des changements dans la composition des milieux de culture pouvaient conduire à la production de plus d'une trentaine de variants de la cyclosporine [226].





Le sigle ɛLys indique que la lysine est liée au Dhb (2,3-dihydroxybenzoate) ou à la glycine par le groupe NH2 de sa chaîne latérale. Le terme Aro désigne un acide aminé aromatique qui peut être soit une phénylalanine (Phe) soit un tryptophane (Trp). La stéréochimie de ce dernier est modifiée par un domaine d'épimérisation faisant partie du module AmoG. Le fonctionnement itératif, alternatif ou optionnel est indiqué à chaque endroit où il intervient.

3.2.5. NRPs : diversité de structures et d'activités

Les synthétases de peptides non ribosomiques constituent une source quasi intarissable de produits naturels dont la composition et la structure sont extrêmement variées. Cette biodiversité provient avant tout du large éventail de monomères pris en charge par les synthétases. En effet, à la différence de la synthèse ribosomique « classique » qui est limitée aux 20 acides aminés protéinogènes, la synthèse non ribosomique permet d'intégrer, en plus de ces 20 acides aminés, une multitude de substrats comprenant d'autres acides aminés dits « non protéinogènes », ainsi que des glucides, des lipides, ou encore des polycétides. Au total, plus de 500 monomères différents ont été identifiés comme des composants de NRPs [227]. Si certains de ces monomères sont directement intégrés sous leur forme native, d'autres subiront des modifications durant l'assemblage du NRP via l'activité des domaines secondaires présents dans la synthétase. La multiplicité des réactions engendrées (épimérisation, méthylation, hétérocyclisation, etc) augmente considérablement la diversité des peptides générés. Par ailleurs, l'étape de terminaison est à l'origine d'une diversification supplémentaire puisque le peptide assemblé peut être libéré sous forme linéaire ou sous forme cyclique. Enfin, les NRPs peuvent être modifiés après leur clivage grâce à des enzymes de décoration [201]. Celles-ci sont souvent codées par des gènes faisant partie du cluster de la NRPS. C'est le cas par exemple de la N²-transacylase SidG chargée de la tri-acétylation de la fusarinine C, un sidérophore excrété par Aspergillus fumigatus [228], ou encore des glycosyltransférases impliquées dans la décoration des aglycones nécessaire à l'activité antibiotique de la vancomycine [229] et de l'érythromycine [230].

Outre la variété des monomères intégrés, les peptides non ribosomiques se caractérisent par leur diversité structurale. L'étude des NRPs inventoriés dans Norine (https://bioinfo.lifl.fr/norine/), l'unique base de données consacrée à l'analyse des NRPs, permet d'apprécier cette diversité de structures (Figure 28A). Parmi les 1199 NRPs répertoriés à ce jour, trois architectures prédominent : les structures cycliques (37%), les structures partiellement cycliques (27,3%) et les structures linéaires (26,5%). Il existe également des structures branchées comme c'est le cas pour la vibriobactine de *Vibrio cholerae*. Il est intéressant de noter que la diversité de NRPs concerne également leur taille, qui peut varier de 2 à 48 monomères. En moyenne, le nombre de monomères constituant le NRP est de 10 ; les tailles les plus fréquemment rencontrées sont de 7 et 8 monomères (respectivement observées chez 159 et 162 NRPs).



Figure 28. Structure (**A**) et activité (**B**) des peptides non-ribosomiques répertoriés dans Norine. *Note : Certains NRPs possédant des activités multiples ont été pris en compte dans plusieurs catégories représentées sur le diagramme B.* La diversité chimique et structurale des NRPs est à la base de la diversité des activités biologiques observées (Figure 28B). Près de la moitié (45%) des peptides référencés dans Norine présentent une activité antibiotique au sens large (antibactérienne/antifongique/antivirale). Parmi ces NRPs antimicrobiens, on retrouve notamment la gramicidine et la tyrocidine, qui sont des composés anti-Gram positifs décrits en même temps que l'exploration du mécanisme NRPS [231]. A noter que la pénicilline, première substance antibiotique découverte en 1928 par Alexander Fleming à partir d'une souche de *Penicillium notatum*, est également synthétisée par voie non ribosomique [232]. D'autres NRPs antibiotiques tiennent une place importante dans notre système de soins : c'est le cas des glycopeptides comme la vancomycine ou de certains lipopeptides comme la daptomycine dont le spectre d'activité couvre les Gram positifs et notamment les SARM (*S. aureus* méti-R) [233]. L'activité antifongique a été démontrée pour les échinocandines isolées chez différents micromycètes [234], les bacillomycines sécrétées par *Bacillus* spp. [235], ainsi que la gliotoxine et autres peptaïbols produits par *Trichoderma* spp. [236–238]. Enfin, une activité antivirale a été rapportée pour la feglymycine naturellement produite par *Streptomyces* spp. [239], et pour la landornamide A, récemment synthétisée par *E. coli* après reconstruction d'un cluster « silencieux » identifié par analyse bioinformatique chez une cyanobactérie [240].

L'activité cytotoxique intéresse 18% des NRPs repertoriés dans la base de données Norine. Ce groupe inclut notamment les toxines responsables d'intoxication d'animaux domestiques dont certaines représentent un risque sanitaire pour l'homme, comme par exemple les microcystines (cyanotoxines) synthétisées par une multitude de cyanobactéries [241,242]. La production de mycotoxines aux propriétés phytotoxiques et/ou insecticides a également été décrite chez de nombreux champignons filamenteux ; on peut notamment citer les enniatines de *Fusarium* spp. (phytopathogènes des cultures céréalières) [243], les destruxines d'*Alternaria brassicae* (pathogène nécrotrophe du chou, du brocoli et du colza) [244], la sirodesmine de *Leptosphaeria maculans* (agent du phoma du colza) [245], ou encore les beauvericines / bassianolides du champignon entomopathogène *Beauveria bassiana* [246]. Enfin, outre les NRPs « purs », on retrouve dans cette catégorie des hybrides NRP/PK (*i.e.* peptides dont l'assemblage requiert l'action d'une NRPS et d'une polycétide synthétase ou *polyketide synthase*) hautement toxiques, voire cancérogènes pour l'homme, telles que les ochratoxines (mycotoxines) produites par des moisissures des genres *Penicillium* et *Aspergillus* [247].

Les propriétés surfactantes concernent 10% des NRPs. Il s'agit essentiellement de lipopeptides amphiphiles, au premier rang desquels figurent les surfactines qui sont des biotensioactifs synthétisés par les bactéries du genre *Bacillus*. Dotés de propriétés émulsifiantes et détergentes exceptionnelles (Concentration Micellaire Critique (CMC) ~ 10 mg/L), ces composés sont particulièrement intéressants sur le plan écologique compte tenu de leur caractère biodégradable [248]. Les autres familles de lipopeptides produites par *Bacillus* spp., les fengycines et les iturines, possèdent également une activité surfactante [249].

Parmi les autres propriétés fréquemment observées chez les NRPs, on peut signaler l'activité immunomodulatrice/immunosuppressive caractéristique des cyclosporines synthétisées par *Tolypocladium inflatum* [250], les propriétés cytostatiques/antitumorales de la bléomycine produite par *Streptomyces verticillus* [215], ou encore l'activité inhibitrice de protéases de la ruminopeptine issue de *Ruminococcus bromii* [251]. Enfin, lorsque le fer se raréfie, la plupart des champignons filamenteux sécrètent des peptides chélateurs de fer appelés sidérophores [252]. Ces derniers composés sont abordés plus en détail dans la section suivante.

4. Métabolisme du fer chez les microorganismes

4.1. Généralités sur le fer

Le fer constitue le quatrième élément chimique le plus abondant au niveau de la croûte terrestre [253]. Il s'agit d'un composé métallique portant le numéro atomique 26, et symbolisé par le sigle Fe. Dans la classification périodique des éléments (tableau de Mendeleïev), il se place dans la première série de transition entre le manganèse et le cobalt.

Le fer joue un rôle essentiel en tant qu'oligoélément ou micronutriment chez la quasi-totalité des êtres vivants. De par ses propriétés d'oxydo-réduction, le fer est un cofacteur de choix pour une multitude de réactions biochimiques vitales. Il est utilisé majoritairement pour assurer le transport de l'oxygène, ou pour servir de substrat dans des réactions de transfert d'électrons, de synthèse d'acides nucléiques (ADN et ARN), ou de fixation d'azote. Par exemple, le fer entre dans la composition des centres fer-soufre (Fe-S), notamment ceux présents au niveau des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale [254]. Le fer est également un élément fondamental pour plusieurs protéines héminiques telles que l'hémoglobine, les catalases/peroxydases, ou encore certains cytochromes. C'est aussi un cofacteur d'enzymes indispensables à la survie comme par exemple les ribonucléotide réductases de classe I, qui catalysent la formation de désoxyribonucléotides (nécessaires à la réplication de l'ADN) à partir de ribonucléotides [255]. Ainsi, un déficit en fer peut entraîner de multiples effets délétères pour le microorganisme, incluant défaut de croissance, diminution de la synthèse d'acides nucléiques, ralentissement du métabolisme respiratoire et réduction des capacités à détoxifier les espèces réactives de l'oxygène. A ce jour, seuls les lactobactéries et l'agent responsable de la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi*, sont connus pour leur indépendance vis-à-vis du fer (qu'ils substituent par le manganèse) [256,257].

En solution, le fer peut exister sous deux états d'oxydation : le fer ferreux (Fe²⁺, forme réduite), capable notamment de réagir avec l'oxygène, et le fer ferrique (Fe³⁺, forme oxydée), très peu soluble. Malgré son abondance sur Terre, le fer est en réalité très peu disponible pour les êtres vivants. En effet, en présence d'oxygène, le fer ferreux tend à s'oxyder en fer ferrique qui, dans l'environnement, réagit avec les ions hydroxydes (HO⁻) pour former des précipités d'hydroxyde ferrique [Fe(OH)₃] insolubles et inassimilables [258]. Ces complexes sont si stables que la concentration en fer disponible pour les organismes telluriques n'est que de l'ordre de 10^{-9} à 10^{-18} M [259]. Chez leur hôte mammifère, les microorganismes pathogènes sont confrontés à une limitation encore plus importante des ressources en fer puisque celui-ci est séquestré par des protéines spécialisées telles que l'hémoglobine, la ferritine, la transferrine ou la lactoferrine. Par conséquent, la concentration en fer biodisponible chez l'hôte est extrêmement faible, de l'ordre de 10^{-24} M environ dans le sérum, alors qu'une croissance bactérienne optimale nécessite une concentration en fer comprise entre 10^{-7} et 10^{-5} M [260].

Afin de contourner cette faible biodisponibilité, les microorganismes et notamment les champignons ont élaboré diverses stratégies pour subvenir à leurs besoins en fer. L'exécution de ces stratégies (Figure 29) dépend non seulement de la quantité de fer disponible dans l'environnement, mais aussi de la forme sous laquelle il se trouve (ionique, héminique, ou complexé), et de ses différents degrés d'oxydation.



Figure 29. Mécanismes d'acquisition du fer par les microorganismes, adapté de Kronstad et al. [261].

Fetp, ferroxydase cuivre-dépendante ; Frep, réductase ferrique ; Ftrp, perméase du fer ferrique ; Sec, sidérophores extracellulaires ; Sic, sidérophores intracellulaires ; SITs, transporteurs spécifiques des complexes ferri-sidérophores ; Tf, transferrine ; TNS, transporteurs non-spécifiques des cations divalents. Les résidus de sidérophores obtenus après dégradation sont représentés par des hexagones en pointillés.

4.2. L'assimilation et le stockage du fer chez les microorganismes

4.2.1. Assimilation médiée par les sidérophores

Le mécanisme le plus répandu chez les microorganismes pour assurer l'acquisition du fer consiste en l'utilisation de sidérophores (du grec *sideros* : « fer », et *phorein* : « porter »). Ces composés sont produits par la quasi-totalité des microorganismes procaryotes ou eucaryotes, à l'exception de *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans* et *Cryptococcus neoformans* [259]. Bien que ces trois derniers ne soient pas capables de synthétiser leurs propres sidérophores, ils possèdent l'information génétique permettant d'utiliser des sidérophores produits par d'autres organismes, qualifiés alors de xénosidérophores. Enfin, certaines espèces de plantes (graminées) sont capables de récupérer le fer présent dans le sol par le biais de phytosidérophores [262], qui ne seront pas abordés ici.



a) Les différentes classes de sidérophores



(A) Les différents groupements impliqués dans la chélation du fer : carboxylate (orange), phénolate (vert), catécholate (rouge), et hydroxamate (bleu). (B) Exemples de sidérophores synthétisés par divers agents bactériens et fongiques. Les sidérophores dits « mixtes » sont composés d'au moins 2 groupements chimiques distincts (ex : catécholate/hydroxamate, phénolate/carboxylate).

Les sidérophores sont des molécules de faible masse moléculaire (500 à 1500 Da) capables de chélater le fer ferrique avec une très haute affinité [264]. A ce jour, plus de 500 sidérophores ont été identifiés et classés en quatre grandes familles chimiques, fonction du groupe assurant la chélation des ions Fe³⁺ : les catécholates, les carboxylates, les phénolates et les hydroxamates (Figure 30). Certains sidérophores sont constitués d'un seul type de groupement chélateur, tandis que d'autres se caractérisent par deux, voire trois groupements différents ; on parle alors de sidérophores « mixtes ».

A l'exception des composés de type phénolates, les différents groupes fonctionnels jouent le rôle de ligands bidentates, occupant chacun deux sites de coordination parmi les six disponibles par atome de fer. La diversité des structures observées chez les sidérophores (1, 2 ou 3 groupements chélateurs) engendre différentes stoechiométries pour la formation des complexes ferri-sidérophores. Ainsi, si le sidérophore est bidenté, le ratio fer-ligand est de 1:3. En réalité, la plupart des sidérophores possèdent deux ou trois groupements fonctionnels, formant ainsi des ligands tétradentates (ratio 3:2) ou hexadentates (ratio 1:1).

La constante d'affinité (K_{aff}) est variable d'un sidérophore à l'autre. Elle est couramment supérieure à 10^{30} M⁻¹, en particulier si le sidérophore possède une structure cyclique. Toutefois, le pouvoir chélatant d'un sidérophore est mieux apprécié *via* la mesure de son pFe³⁺. Le pFe³⁺ est une valeur logarithmique dépendante du pH, déterminée à pH 7,4 pour une concentration totale en ions Fe³⁺ égale à 1 µM et celle du ligand égale à 10 µM, soit pFe= $-\log[Fe^{3+}]_{libre}$ (Tableau 4) [265]. Ainsi, plus la valeur du pFe³⁺ est élevée, plus le complexe ferri-sidérophore est stable. Par exemple, à pH physiologique, un pFe³⁺ ≥ 20 est requis pour déplacer le fer lié à la transferrine [266].

Composé	Structure	Denticité	Log K _{aff} (Fe ³⁺)	pFe ³⁺
A. Hydroxamate				
Acide rhodotorulique	Linéaire	4	22	21,9
Coprogène	Linéaire	6	29,35	25,6
Exocheline MS	Linéaire	6	28,9	25
Ferricrocine	Cyclique	6	30,4	26,5
Ferrichrysine	Cyclique	6	29,96	25,8
Ferrichrome	Cyclique	6	32	25,2
Ferrioxamine B	Linéaire	6	30,6	26,6
Ferrioxamine E	Cyclique	6	32,2	27,3
B. Catécholate				
Amonabactine T	Linéaire	4	34,5	26
Bacillibactine	Cyclique	6	47,6	33,1
Entérobactine	Cyclique	6	49	35,5
C. Carboxylate				
Acide muginéique	Linéaire	6	32,5-33,33	-
Rhizoferrine	Linéaire	6	25,3	19,7
Staphyloferrine B	Linéaire	6	-	23,6
D. Mixte				
Aérobactine ^a	Linéaire	6	27,6	23,3
Azotobactine ^b	Linéaire	6	28,1	27,8
Pyoverdine ^c	Cyclique	6	30,8	27

Tableau 4. Structure et affinité des sidérophores pour le fer ferrique.

(a), carboxylate/hydroxamate; (b), carboxylate/hydroxamate/catécholate; (c), carboxylate/hydroxamate; (-), non déterminé.

b) Biosynthèse et sécrétion des sidérophores

La production des sidérophores peut s'opérer de deux manières. La première fait intervenir une enzyme de type NRPS, tandis que la seconde est NRPS-indépendante. En règle générale, la biosynthèse des aryl-sidérophores (*i.e.* phénolates et catécholates) nécessite l'action d'une NRPS, alors que les carboxylates et les hydroxamates sont habituellement produits selon une voie NRPS-indépendante [259].

Chez les champignons, la quasi-totalité des sidérophores produits fait appel au mécanisme NRPS. A ce jour, la seule exception connue est la rhizoferrine, un polycarboxylate produit par certaines espèces de Mucorales (notamment les *Rhizopus* spp.) à partir de citrate [267,268]. Les sidérophores fongiques empruntant la voie des NRPSs, quant à eux, appartiennent tous à la grande famille des hydroxamates [228]. Ceux-ci peuvent être classés en quatre sous-familles : les fusarinines, les coprogènes, les ferrichromes et l'acide rhodotorulique (**Figure 31**). Il s'agit de di-, tri- ou hexa-peptides à très haute affinité pour les ions Fe³⁺, dont la stabilité peut être augmentée après cyclisation comme c'est le cas pour les ferrichromes et la plupart de fusarinines.



Figure 31. Principaux représentants de chaque famille de sidérophore fongique, adapté de Haas [228]. Hormis l'acide rhodotorulique, les sidérophores sont représentés sous leur forme liée au Fe^{3+} (en bleu). Les liaisons peptiques et les liaisons esters sont indiquées en rouge et vert, respectivement. Pour la triacétylfusarinine C, le radical R = acétyl ; pour la fusarinine C, R = H. Les hydroxamates fongiques dérivent tous de l'ornithine (Figure 32). Il s'agit d'un acide aminé non-protéinogène pouvant franchir la membrane interne de la mitochondrie grâce à un transporteur (AmcA chez *A. fumigatus*) fonctionnant avec l'énergie du gradient chimio-osmotique de la membrane. L'ornithine peut également être générée dans le cytoplasme après hydrolyse de l'arginine par une arginase (AgaA).





Les enzymes clés de la synthèse des sidérophores sont représentées par des rectangles bleus. Les flèches rouges indiquent les enzymes dont les gènes sont induits lors d'une carence en fer. Les flèches en pointillés représentent des réactions multi-étapes. La mitochondrie et le peroxisome sont colorés en gris et jaune, respectivement. AmcA, transporteur mitochondrial de l'ornithine ; AgaA, arginase ; FsC, fusarinine C ; FC, ferricrocine ; HFC, hydroxyferricrocine ; Hmg1, Hydroxyméthylglutaryl-CoA (HMG-CoA) reductase ; PptA, 4'-phosphopantéthéinyl transférase ; SidA, L-ornithine-N⁵-monooxygénase ; SidC, ferricrocine synthétase ; SidD, fusarinine C synthétase ; SidF, mévalonyl-CoA hydratase ; SidH, énoyl-CoA hydratase ; SidI, mévalonyl-CoA ligase ; SidG, fusarinine C transacétylase ; SidL, N-acetyltransférase ; TAFC, triacétylfusarinine C. Le point d'interrogation désigne une hydroxylase non caractérisée à l'heure actuelle.

La succession des étapes conduisant à la production des hydroxamates fongiques a été étudiée en détail chez plusieurs champignons filamenteux, en particulier *Aspergillus fumigatus* [228] (Figure 32). L'étape initiale, commune à l'ensemble des hydroxamates fongiques, consiste en l'hydroxylation de l'ornithine par une L-ornithine- N^5 -monooxygénase (baptisée SidA chez *A. fumigatus*). Le composé N^5 -hydroxy-L-ornithine ainsi généré va ensuite subir une réaction d'acylation, qui conditionnera le sous-type de sidérophore produit. Par exemple, pour l'acide rhodotorulique et la majorité des ferrichromes, l'intermédiaire N^5 -hydroxy-L-ornithine sera combiné à un résidu acétyl (générant un motif N^5 -acétyl- N^5 -hydroxy-L-ornithine), tandis que pour les sidérophores de type fusarinine et coprogènes, c'est un résidu anhydromévalonyl qui sera choisi (générant un motif N^5 -anhydromévalonyl- N^5 -hydroxy-L-ornithine). A noter que le motif anhydromévalonyl-CoA requis pour cette dernière réaction est généré dans le peroxysome à partir du mévalonate, liant ainsi la voie de biosynthèse des sidérophores à celle des isoprénoïdes.

L'assemblage des motifs N^5 -acyl- N^5 -hydroxy-L-ornithine est ensuite orchestré par une NRPS. La liaison covalente établie entre deux motifs peut être soit une liaison ester (fusarinines, coprogènes) soit une liaison peptidique (acide rhodotorulique, ferrichromes, coprogènes) (**Figure 31**). Par ailleurs, le nombre de motifs N^5 -acyl- N^5 -hydroxy-L-ornithine constituant le sidérophore varie en fonction de la NRPS impliquée. Le composé le plus simple est l'acide rhodotorulique, issu de l'assemblage de seulement deux motifs (positionnés tête-bêche), contre trois pour les fusarinines, les coprogènes et les ferrichromes. En outre, à la différence des fusarinines et des coprogènes qui sont des tripeptides, les ferrichromes présentent la particularité d'intégrer, en plus des trois motifs N^5 -acyl- N^5 -hydroxy-L-ornithine, trois autres monomères sélectionnés parmi glycine, sérine et alanine, formant ainsi un hexapeptide. Enfin, les sidérophores peuvent subir, comme d'autres peptides non-ribosomiques, une ou plusieurs modifications après leur libération par la machinerie NRPS. C'est notamment le cas pour la ferricrocine et la fusarinine C, qui seront respectivement mono-hydroxylée et tri-acétylée chez *A. fumigatus* [228].

A l'heure actuelle, peu d'informations sont disponibles sur les mécanismes d'export des sidérophores. Chez les procaryotes, la sécrétion des sidérophores s'effectuerait *via* des pompes d'efflux localisées au niveau de la membrane plasmique. Ces transporteurs utilisent l'énergie fournie par dissipation d'un gradient de protons (familles MFS : *major facilitator superfamily*, et RND : *resistance, nodulation and cell division*) ou par hydrolyse de l'ATP (famille ABC : *ATP-binding cassette*) [259]. Chez les champignons, les données restent encore très parcellaires ; pour *A. fumigatus*, le mécanisme d'efflux serait assuré par un transporteur de type ABC (SitT), dont il existe un orthologue surexprimé en cas de carence martiale chez *A. nidulans* et *A. niger* [269,270].

c) Import et dissociation des complexes ferri-sidérophores

L'acquisition du fer complexé à un sidérophore fait appel à deux mécanismes distincts : soit le fer est intégré en tant qu'élément 'simple' suite à sa réduction par des réductases présentes à la surface cellulaire (voir §4.2.2.a), soit le complexe ferri-sidérophore est importé en intégralité *via* des transporteurs membranaires spécifiques. Ces derniers appartiennent à la sous-famille SIT (*siderophore iron transporters*) des transporteurs MFS chez les champignons, tandis que les bactéries utilisent exclusivement des transporteurs de type ABC.

Il est intéressant de noter que les transporteurs SITs sont exprimés non seulement par les champignons producteurs de sidérophores, mais aussi par ceux qui n'en produisent pas [228]. Par exemple, la levure S. cerevisiae, non-productrice de sidérophores, est capable de pirater à la fois des sidérophores fongiques et des sidérophores bactériens en utilisant quatre transporteurs relativement spécifiques d'un sidérophore donné : Arn1p pour l'import des ferrichromes constitués de résidus anhydromévalonyl, Taf1p/Arn2p pour l'internalisation spécifique de la triacétylfusarinine C (produite par A. fumigatus), Sit1p/Arn3p utilisé préférentiellement pour l'acquisition de la ferrioxamine B (produite par Streptomyces spp.), et Enb1p/Arn4p pour l'import spécifique de l'entérobactine (produite par divers bacilles à Gram-, dont E. coli). La levure pathogène C. albicans, quant à elle, exprime à sa surface un seul SIT à « large spectre » (CaArn1p/CaSit1p), permettant l'acquisition du fer lié à différents hydroxamates fongigues comme le coprogène, la ferricrocine, la ferrichrysine, ou encore la triacétylfusarinine C [271]. De façon similaire, les champignons producteurs de sidérophores synthétisent une multitude de transporteurs chargés d'assurer le rapatriement de leurs propres sidérophores et parfois même l'acquisition de xénosidérophores. A titre d'exemples, les moisissures A. nidulans et A. fumigatus synthétisent pas moins de 10 et 7 SITs, dont MirB (major facilitator iron regulated B), impliqué dans l'import de la triacétylfusarinine C (leur sidérophore majoritaire), et MirA, qui permet à A. nidulans d'assimiler l'entérobactine. Les transporteurs SITs jouent donc un rôle majeur dans la bataille pour les ressources en fer, notamment dans les environnements polymicrobiens (*e.g.* poumon mucoviscidosique).

Après son internalisation, le fer est libéré de son sidérophore et ainsi rendu disponible pour le métabolisme cellulaire, ou stocké au sein de vacuoles ou par liaison à des sidérophores strictement intracellulaires – *i.e.* non sécrétés – afin d'éviter les phénomènes oxydatifs (voir §4.2.3. Stockage et remobilisation du fer intracellulaire). Il existe deux mécanismes principaux permettant le relargage du fer depuis un sidérophore importé. Le premier implique une réduction du complexe ferri-sidérophore par des réductases cytosoliques. Il s'agit d'un mécanisme non-destructif, autorisant la resécrétion de l'apo-sidérophore (*i.e.* sidérophore déferrisé) [272]. Le second mécanisme, lui, recourt à la dégradation du sidérophore. C'est le cas chez *A. fumigatus* qui utilise deux estérases, EstB et SidJ, spécialisées dans l'hydrolyse des liaisons esters de la triacétylfusarinine C et de la fusarinine C, respectivement [273,274]. Les produits de dégradation (*N*⁵-anhydromévalonyl-*N*⁵-hydroxy-L-ornithine ou 'unités fusarinines') pourront être sécrétés dans l'état ou être utilisées pour la synthèse de nouvelles molécules de l'apo-sidérophore.

4.2.2. Les autres systèmes d'assimilation du fer

En plus de l'internalisation de (xéno-)sidérophores, la plupart des organismes fongiques font appel à d'autres systèmes d'acquisition du fer (Figure 29), qui peuvent d'ailleurs co-exister au sein d'une même espèce.

a) Assimilation par réduction du fer (RIA)

L'assimilation réductive du fer ou RIA (<u>*Reductive Iron Assimilation*</u>) constitue un mécanisme très largement répandu au sein du règne fongique. Il permet, tout comme l'internalisation du complexe ferri-sidérophore, d'acquérir le fer avec une très haute affinité.

Le processus RIA se déroule en deux étapes : des réductases ferriques (famille FRE) localisées au niveau de la membrane cytoplasmique assurent dans un premier temps la réduction des ions Fe^{3+} en ions Fe^{2+} , puis un complexe protéique véhicule le Fe^{2+} à travers la membrane suite à sa ré-oxydation en Fe^{3+} (**Figure 29**). La plupart des champignons possèdent dans leur génome plusieurs gènes codant des métalloréductases de la famille FRE. Pas moins de 17 gènes putatifs pour des réductases ont été détectés dans le génome de *C. albicans*, mais seuls deux d'entre eux (*FRE7* et *FRE10*) codent des réductases participant à la RIA [275]. Chez *S. cerevisiae*, les réductases Fre1p, Fre2p, Fre3p et Fre4p ont montré leur implication dans cette première étape de réduction [276]. L'apparente redondance de ces homologues permet en réalité au champignon d'assimiler le fer à partir de multiples sources : citrate ferrique, chlorure ferrique, holo-transferrine (*i.e.* transferrine chargée de deux ions Fe^{3+}), et même des complexes ferri-sidérophores. Si les protéines Fre1p et Fre2p endossent la majorité de l'activité sidérophore-réductase (incluant hydroxamates et catécholates dont l'entérobactine), l'homologue Fre3p peut utiliser un panel relativement large d'hydroxamates comme substrat, tandis que Fre4p présente une activité réductase spécifique de l'acide rhodotorulique. Compte tenu de la faible affinité des sidérophores et de la transferrine vis-à-vis des ions Fe^{2+} (10^{10} fois moindre que pour les ions Fe^{3+})

Une fois réduit, l'ion Fe²⁺ est pris en charge par un complexe protéique à haute affinité, aboutissant à son internalisation. Ce complexe est constitué d'une ferroxydase et d'une perméase spécifiques, permettant successivement la ré-oxydation du fer en Fe³⁺, puis son transfert à travers la membrane cytoplasmique. Chez *S. cerevisiae*, ces actions sont assurées par le couple ferroxydase/perméase Fet3p/Ftr1p. Opérant avec une constante de Michaelis (Km) extrêmement basse (de l'ordre de 0,2 μ M), ce tandem est l'un des plus performants parmi les systèmes de transport de molécules et de particules élémentaires [272]. A noter que l'adressage membranaire de Fet3p et Ftr1p ne peut se faire que sous forme appariée Fet3p/Ftr1p ; en effet, les protéines Fet3p et Ftr1p sont retenues au niveau du réticulum endoplasmique jusqu'à l'arrivée de leur partenaire. Les couples Fet3p/Ftr1p ainsi formés resteront soudés durant tout leur traffic intracellulaire, et même après leur adressage à la membrane [278]. En outre, le chargement de l'apo-Fet3p avec quatre atomes de cuivre (indispensable pour l'activité ferroxydase) nécessite l'expression de *Ftr1*. Inversement, la perméase Ftr1p prend uniquement en charge les ions Fe³⁺ générés par Fet3p, l'acquisition du fer étant abrogée chez les mutants Fet3p dénués d'activité ferroxydase [279]. Les couples Fet3p/Ftr1p fonctionnement donc systématiquement de pair, et forment un complexe hautement spécialisé dans le recrutement et l'acquisition du fer ferreux.

b) Acquisition du fer ferreux à faible affinité

Lorsque le fer est facilement accessible, les systèmes d'acquisition de haute affinité (*i.e.* sidérophores et RIA) ne sont pas ou peu exprimés. Sur le plan moléculaire, un mécanisme d'acquisition directe du fer ferreux, à faible affinité, a été décrit chez *S. cerevisiae*. Ce processus fait appel à des transporteurs transmembranaires non-spécifiques de cations divalents (Mn²⁺, Cd²⁺, Cu²⁺ et Fe²⁺). On en recense 2 types : le transporteur Fet4p, présentant une faible affinité envers les 4 cations sus-mentionnés (et donc également une faible spécificité), et les transporteurs Smf1p/Smf2p, plus particulièrement affins pour le manganèse [280]. De façon intéressante, le niveau d'expression du transporteur Fet4p augmente considérablement en réponse à une déplétion en oxygène [281,282]. Ainsi, Fet4p pourrait constituer le principal système d'acquisition du fer lorsque *S. cerevisiae* se trouve dans des environnements hypoxiques ou anaérobies, et ce d'autant plus que (i) le fer extracellulaire est présent sous forme ferreuse (et donc, plus soluble) lorsque l'oxygène se fait plus rare, et que (ii) le complexe protéique Fet3p/Ftr1p de haute affinité est non-fonctionnel en l'absence d'oxygène.

c) Assimilation du fer héminique

Environ 80% du fer présent chez l'hôte mammifère est lié aux noyaux hèmes (protoporphyrine IX) de l'hémoglobine et d'autres hémoprotéines comme l'albumine [275]. Il n'est donc pas étonnant que certains champignons pathogènes puissent utiliser l'hème comme source de fer. Bien que les mécanismes moléculaires qui sous-tendent cette assimilation ne soient pas encore totalement élucidés, différents acteurs ont pu être décrits.

Candida albicans est le micromycète le plus étudié pour son potentiel d'acquisition du fer héminique. La croissance de cette levure est en effet stimulée par l'addition d'hémoglobine ou d'hémine dans un milieu de culture déplété en fer [283]. En outre, *C. albicans* exprime des facteurs hémolytiques et des récepteurs de surface pour l'hémoglobine [284,285]. Plus précisément, il semblerait que chez *C. albicans*, la protéine Rbt5p, une mannoprotéine à domaine CFEM (*Common in several <u>Fungal Extracellular Membrane proteins</u>) ancrée dans la membrane plasmique <i>via* une ancre GPI [286], assurerait la liaison à l'hème extracellulaire tout en facilitant son endocytose, tandis que la protéine Hmx1p, possédant une activité de type hème oxygénase, permettrait le relargage intracellulaire du fer à partir de l'hème [283]. Des études récentes soulignent le rôle potentiel de deux autres protéines à domaine CFEM, Pga7p et Csa2p, dans l'acquisition du fer lié à l'hème : Pga7p, en tant que protéine coopérant avec Rbt5p au niveau de l'enveloppe cellulaire et facilitant l'endocytose de l'hème [287], et Csa2p, en tant qu'hémophore capable d'acheminer l'hémoglobine jusqu'aux protéines Rbt5p et Pga7p [288,289]. *In vitro*, l'hémophore Csa2p a également montré son aptitude à extraire le noyau héminique contenu dans l'albumine, la protéine sérique la plus abondante chez l'homme [290]. A noter que les mécanismes d'assimilation du fer héminique ne font pas intervenir les sytèmes de haute affinité tels que la RIA ou les sidérophores.

D'autres champignons sont également capables d'utiliser le fer héminique pour leur activité métabolique [275]. C'est par exemple le cas des levures *C. tropicalis* et *C. parapsilosis*, qui font partie du même clade que *C. albicans* (clade CTG) [291]. A contrario, *C. krusei* et *C. glabrata* qui sont phylogénétiquement éloignés de *C. albicans*, sont incapables de croître en présence d'hémoglobine [275]. Parmi les champignons dimorphiques, *Histoplasma capsulatum* [292], *Cryptococcus neoformans* [293,294] et *Paracoccidioides* spp.

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez *Scedosporium apiospermum*, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose [295] ont montré leur capacité à assimiler l'hème comme unique source de fer. L'expression de protéines à domaine CFEM, d'hémolysines et/ou d'hémophores fournit une première explication pour l'acquisition du fer héminique chez ces organismes. En revanche, la plupart des filamenteux 'purs' dont *A. fumigatus* et *A. nidulans* sont incapables d'utiliser l'hème comme source de fer, et ce, malgré la présence de gènes codant des protéines à domaine CFEM [8,296,297].

4.2.3. Stockage et remobilisation du fer intracellulaire

Le fer est un élément paradoxal dans la mesure où, s'il est indispensable à la vie cellulaire, il est aussi potentiellement dangereux de par sa capacité à catalyser la production d'espèces réactives de l'oxygène, en particulier lorsqu'il n'est pas parfaitement pris en charge, ou lorsqu'il est présent en excès. Par conséquent, les microorganismes et notamment les champignons ont dû développer, en plus des stratégies d'acquisition du fer, des mécanismes de rétention permettant une accumulation « inoffensive » du fer. Les organismes fongiques étant incapables d'utiliser la ferritine comme molécule détoxifiante (à la différence des bactéries), le fer en excès sera stocké soit par liaison à des sidérophores intracellulaires, soit après internalisation au sein de vacuoles.

Aspergillus nidulans produit de la desferri-ferricrocine (dFC), un sidérophore qui participe au stockage du fer intracellulaire [298]. Ce sidérophore, dont l'assemblage est orchestré par la synthétase SidC (NRPS), est essentiel à la morphogenèse et à la survie du champignon. En effet, l'absence de biosynthèse de dFC chez le mutant $\Delta sidC$ provoque une augmentation de la sensibilité au stress oxydatif et un retard de germination. En condition de carence martiale, la dFC s'accumule dans les conidies de manière à prévenir la toxicité du fer en voie d'acquisition. Lorsque le fer se trouve en excès, celui-ci est accaparé sous forme de ferricrocine (forme ferrisée de la dFC), qui s'accumule dans les conidies et les hyphes. Chez *A. fumigatus*, la ferricrocine est utilisée strictement pour le stockage du fer dans les filaments mycéliens, tandis que son dérivé hydroxylé (hydroxyferricrocine) sert uniquement à l'accumulation du fer dans les conidies [299,300]. De façon intéressante, il a été montré que la ferricrocine pouvait aussi assurer l'acheminement du fer entre les différentes structures cellulaires, *i.e.* des hyphes aux conidies *via* les phialides et conidiophores [300]. Ces résultats, qui sont comparables à ceux rapportés pour d'autres espèces fongiques [301–303], illustrent l'importance et les spécificités des sidérophores dans le stockage et le traffic du fer intracellulaire.

Outre les sidérophores, la plupart des champignons utilisent le compartiment vacuolaire où le fer y est entreposé sous forme de polyphosphates [304]. *Chez S. cerevisiae*, l'internalisation du fer dans la vacuole est médiée par un transporteur spécifique, Ccc1p, tandis que l'export du fer de la vacuole vers le compartiment cytosolique fait appel à un système tripartite réductase/ferroxidase/perméase (Fre6p/Fet5p/Fth1p), dont l'homologue (Fre1-2p/Fet3p/Ftr1p) est chargé d'importer le fer depuis le milieu extracellulaire selon le mécanisme RIA [305] (voir §4.2.2.a). Assimilation par réduction du fer (RIA)). La majorité du fer ainsi mobilisé sera ensuite redirigé vers la mitochondrie afin de répondre aux besoins cellulaires (chaîne respiratoire, formation de noyaux fer-soufre...).

4.3. Organisation génomique des gènes impliqués dans le métabolisme du fer

La plupart des gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport des sidérophores fongiques sont organisés en cluster(s), c'est-à-dire qu'ils sont regroupés dans une ou plusieurs régions restreintes du génome (soit quelques kilobases). Cette structuration permet de faciliter la co-régulation des différents acteurs participant à une même voie métabolique.

Le nombre et l'agencement des clusters de sidérophores est variable d'une espèce à l'autre, et ce, même au sein d'un même genre. Par exemple, 3 clusters ont été décrits chez *A. fumigatus* et *A. nidulans*, contre 2 chez *A. niger* [270] (Figure 33). Un cluster comprenant les gènes *sidC* (NRPS-sidérophore intracellulaire) et *sidI* (mévalonyl-CoA ligase) paraît conservé chez ces trois espèces, même si ce cluster intègre également un gène « *sidF*-like » chez *A. nidulans*. Le deuxième cluster d'*A. niger*, quant à lui, est formé par une combinaison de *sidD* (NRPS-sidérophore extracellulaire), *sidF* (mévalonyl-CoA hydratase) et *sidH* (énoyl-CoA hydratase), ainsi qu'un orthologue de *sitT* (protéine d'efflux de type ABC) et de *mirB* (protéine d'import de type MFS (sous-famille SIT)). Chez *A. fumigatus et A. nidulans*, le gène *mirB* est localisé dans un troisième cluster en combinaison avec *estB* (estérase) et *sidG* (acétyl-transférase). Ce dernier cluster est séparé du cluster *sidDFH* par une courte région de 56-kb chez *A. fumigatus*, alors que chez *A. nidulans*, les 2 clusters sont présents sur deux chromosomes distincts. A noter que les gènes *sidA* (ornithine monooxygénase) et *sidL* (hydroxyornithine acétyltransférase) ne font partie d'aucun cluster chez les *Aspergillus*. A l'inverse, *sidA* et *sidL* sont clusterisés chez d'autres champignons producteurs de sidérophores [306]. Le gène *sidA* fait habituellement partie du cluster de *sidC*, en remplacement de *sidI*. Le gène *sidL*, lui, est fréquemment retrouvé dans le cluster *sidDFH*, qui peut également héberger *sidI*.



Figure 33. Organisation des gènes impliqués dans la biosynthèse et le transport des sidérophores chez A. nidulans (FGSC A4), A. fumigatus (Af293) and A. niger (CBS 513.88), d'après Franken et al. [270]. Les gènes homologues sont représentés de la même couleur. Les flèches noires indiquent les gènes présents chez les autres espèces mais non-clusterisés. Les flèches blanches aux contours gris indiquent les gènes spécifiques d'une espèce. *, la région entre AFUA_3G3440 et AFUA_3G3630 couvre 56 kilobases contenant uniquement des gènes non impliqués dans le métabolisme du fer. Les gènes impliqués dans la RIA, quant à eux, ne sont que partiellement clusterisés. En effet, les orthologues de *fet3p* (ferroxidase) et *ftr1p* (perméase) sont systématiquement disposés en tandem et se retrouvent sous le contrôle du même promoteur [296]. En revanche, les gènes de la famille *FRE* (Fe³⁺-réductases) sont répartis de façon aléatoire dans le génome. De même, les gènes assurant l'acquisition du fer héminique ne sont pas regroupés sous forme de clusters.

4.4. Régulation du métabolisme du fer chez les champignons

Compte-tenu de son rôle essentiel mais potentiellement toxique, l'homéostasie du fer doit être finement régulée. Pour s'adapter aux variations de biodisponibilité – *i.e.* carence martiale, ou à l'inverse excès de fer – les champignons adoptent deux stratégies opposées pour la régulation de son métabolisme. Chez *A. fumigatus*, ces variations aboutissent à un profond remodelage transcriptionnel impactant jusqu'à 13% des gènes codant des protéines [269].

Chez A. fumigatus et A. nidulans, le maintien de l'homéostasie du fer fait appel à deux principaux facteurs de transcription, SreA et HapX [269,307–309]. SreA est un facteur de transcription en doigt de zinc de type GATA, se fixant spécifiquement sur une séquence consensus « ATCW<u>GATA</u>A». Lorsque le fer est en quantité non-limitante, SreA réprime les systèmes d'acquisition du fer de haute affinité (*i.e.* sidérophores et RIA) tout en stimulant le métabolisme consommateur de fer. Inversement, en condition de carence martiale, le facteur de transcription de type bZIP HapX est chargé de ralentir les voies métaboliques consommatrices de fer, telles que la synthèse d'hème, la respiration mitochondriale, ou encore la production de centres Fe-S [296]. Parallèlement, HapX active la biosynthèse des sidérophores et de leur précurseur, l'ornithine [309]. HapX agit *via* une interaction physique avec le complexe de liaison à l'ADN appelé CBC (<u>CCAAT-binding complex</u>). Le CBC est un complexe hétérotrimérique conservé chez tous les eucaryotes. Chez *A. nidulans*, l'inactivation d'une de ses sous-unités (HapB, HapC ou HapE) mime les défauts d'adaptation à la carence martiale observés en cas de déficience en HapX. A noter que le CBC n'intervient pas uniquement dans la réponse au facteur HapX, puisqu'il modulerait l'expression d'environ 30% de l'ensemble des gènes [228].

Les facteurs SreA et HapX sont interconnectés dans une boucle de rétroaction négative (Figure 34) : SreA réprime l'expression de *hapX* en conditions non-déplétées en fer ; inversement, HapX réprime *sreA* en conditions de carence martiale. De plus, SreA et HapX subissent une régulation post-traductionnelle par le fer (plus précisément, les centres Fe-S), qui active SreA tout en bloquant les fonctions de HapX. Chez *A. fumigatus* et *A. nidulans*, l'inactivation concomitante de HapX et SreA aboutit à un phénotype non-viable, ce qui souligne l'importance de l'homéostasie du fer dans la survie de ces organismes. En outre, le déficit en HapX (mais pas en SreA) s'accompagne d'une réduction de virulence dans les modèles murins d'aspergillose invasive, illustrant le rôle crucial de l'adaptation aux conditions de carence martiale pour le maintien de la virulence [269,309].



Figure 34. Régulation du métabolisme du fer par SreA et HapX chez *Aspergillus* spp., adapté de Haas [296]. *BS, biosynthèse des sidérophores ; RIA, assimilation réductive du fer.*

La plupart des micromycètes expriment des orthologues de SreA et HapX. L'importance des orthologues de HapX dans la virulence a été montrée chez *C. albicans* et *C. neoformans* [306,310,311]. En revanche, et de façon similaire à *A. fumigatus*, la protéine Sfu1 (orthologue de SreA) n'est pas fondamentale pour la virulence de *C. albicans* dans un modèle de candidose systémique [312]. Sfu1 est néanmoins indispensable pour la persistance de *C. albicans* en tant que commensal du tube digestif, un environnement riche en fer. La levure *S. cerevisiae*, qui ne possède pas d'orthologue de SreA et HapX, emploie des régulateurs différents, Aft1/2 et Cth1/2, qui sont conservés uniquement chez les *Saccharomycotina* [313]. Néanmoins, tout comme pour SreA et HapX, ces régulateurs apprécient la quantité de fer disponible dans la cellule *via* la biogenèse des centres Fe-S. Ces données indiquent une conservation universelle de la machinerie de détection du fer (« iron-sensor ») exécutée par différents types de facteurs de transcription chez des organismes fongiques distincts.

En raison du rôle central du fer, plusieurs autres circuits de régulation sont susceptibles d'influencer la quantité de fer disponible et son niveau d'utilisation. Chez les Aspergillus qui sont des organismes aérobies stricts, la respiration module de façon importante le métabolisme du fer et vice versa. Par exemple, l'hypoxie provoque une augmentation drastique de la quantité de protéines impliquées dans la glycolyse, la respiration mitochondriale et le cycle de Krebs, associée à une élévation du contenu cellulaire en fer/hème (reguis pour la respiration et le cycle de Krebs) [314]. Chez A. fumigatus, l'adaptation aux conditions d'hypoxie est médiée par SrbA, un facteur de transcription appartenant à la famille SREBP (<u>sterol regulatory element binding protein</u>), et conservé chez la plupart des organismes eucaryotes [315]. Outre son action visant à maintenir l'homéostasie des stérols, SrbA est impliqué dans la stimulation de la voie des sidérophores en réponse à l'hypoxie ou à la carence martiale [316]. Cette stimulation des sidérophores médiée par SrbA s'effectuerait en partie via l'activation transcriptionnelle de HapX. En revanche, l'activation transcriptionnelle de SrbA est indépendante des facteurs HapX et SreA. La transcription de SrbA est induite en cas d'hypoxie ou de carence martiale, vraisemblablement en réponse à un déficit en stérols puisque la synthèse des stérols nécessite de l'oxygène et du fer. En outre, la consommation de mévalonate (intermédiaire de synthèse de l'ergostérol) nécessaire à la biosynthèse des sidérophores fongiques (Figure 32) pourrait jouer un rôle supplémentaire en cas de carence martiale. Ces données indiquent que, chez A. fumigatus, la machinerie de détection du fer ferait intervenir le facteur SrbA, en plus de SreA et HapX.

Un rôle dans le métabolisme du fer a également été suggéré pour d'autres protéines régulatrices, telles que le facteur de transcription PacC (*pH-responsive transcription factor*), le facteur de transcription AcuM (*gluconeogenesis-activating transcription factor*), ou encore la MAP kinase (*mitogen-activated protein kinase*) MpkA qui est impliquée dans le maintien de l'intégrité de la paroi cellulaire, la protection contre les espèces réactives de l'oxygène, et d'une façon plus générale, le métabolisme secondaire [228].

4.5. Rôle du métabolisme du fer dans la pathogénie

Un lien entre pathogénie et homéostasie du fer a été démontré chez plusieurs champignons pathogènes. La plupart des études s'appuient sur une comparaison entre des souches sauvages et des souches délétées pour des gènes impliqués dans la biosynthèse des sidérophores ou la RIA.

4.5.1. Rôle des sidérophores

La présence combinée des sidérophores intra- et extracellulaires est cruciale pour le maintien de la virulence chez *A. fumigatus*. En effet, l'élimination complète des sidérophores (mutants $\Delta sidA$) s'accompagne d'une avirulence totale dans un modèle murin d'aspergillose invasive [8,317] (Figure 35), alors qu'une déficience limitée aux sidérophores intra- (mutants $\Delta sidC$) ou extracellulaires (mutants $\Delta sidH$, $\Delta sidH$, $\Delta sidI$ et $\Delta sidD$) n'entraîne qu'une réduction partielle de la virulence [299,318]. Le fait que les mutants déficients en sidérophores extracellulaires ne soient pas totalement avirulents indique une compensation partielle par la RIA. En cohérence avec ce constat, les systèmes RIA et sidérophores intra- et extracellulaires jouent des rôles distincts au cours d'une infection [319]. A noter que les sidérophores intra- et extracellulaires jouent des rôles distincts au cours d'une infection partielle a reconstitution du contenu en HFC au sein des conidies $\Delta sidA$ permet de rétablir la formation des tubes germinatifs, ce qui restaure en partie la virulence [299]. Chez les mutants $\Delta sidG$, le blocage de la production de triacétylfusarinine C (qui s'accompagne d'une accumulation de son précurseur, la fusarinine C) n'est pas associé à une réduction de croissance ou de virulence, ce qui interroge quant à l'utilité de ce sidérophore dans le processus infectieux, alors que sa capacité à soustraire le fer de la transferrine est clairement établie [320].



Figure 35. Rôle des sidérophores et de la RIA dans la virulence d'A. fumigatus, d'après Schrettl et al. [8]. Expérience réalisée sur des groupes de 15 souris neutropéniques inoculées avec 2x10⁵ conidies. Le mutant ΔsidA (incapable de synthétiser le moindre sidérophore) est totalement avirulent. En revanche, la souche complémentée sidA^R ainsi que le mutant ΔftrA (RIA) présentent une virulence comparable à celle de la souche sauvage ATCC4664 (P=0.96 et P=0.17, respectivement).

Outre leur rôle dans le développement des champignons dans un milieu acellulaire, les sidérophores sont également nécessaires à leur croissance en position intracellulaire. Chez *A. fumigatus*, une altération de la voie des sidérophores entraîne une diminution de la croissance et de la survie après phagocytose par des macrophages alvéolaires, qui représentent la première ligne de défense au cours d'une aspergillose pulmonaire [321]. Après phagocytose, les spores d'*A. fumigatus* induisent chez leur cellule hôte des altérations de la réponse immunitaire et de l'homéostasie du fer *via* le système sidérophore [322]. En outre, le gène *sidA* compte parmi les gènes les plus fortement surexprimés après internalisation au sein des cellules épithéliales [323]. De façon similaire, les sidérophores sont importants pour la virulence d'*Histoplasma capsulatum*, un champignon dimorphique qui se multiplie au sein des macrophages lorsqu'il se trouve sous sa forme levure [324].

Compte tenu de l'importance de l'adaptation aux conditions de carence martiale, il n'est pas étonnant que les régulateurs du métabolisme du fer HapX et SrbA, ainsi que PptA (4'-phosphopantéthéinyl transférase activatrice des NRPSs) soient essentiels à la virulence de divers champignons producteurs de sidérophores [228,325].

En plus de leur rôle dans la virulence, les sidérophores interviennent dans les interactions compétitives ou coopératives entre les différents microorganismes présents dans un même environnement. En effet, la chélation du fer par des sidérophores qui ne sont pas reconnus par des organismes compétiteurs peut empêcher ces derniers d'accéder aux ressources en fer. Néanmoins, cette restriction est souvent contournée par l'expression de transporteurs capables de reconnaître les xénosidérophores (protéines SITs), conférant ainsi un avantage à l'organisme compétiteur. Le rôle central des sidérophores dans les interactions microbiennes a été notamment souligné dans le contexte de mucoviscidose, où s'établit une communauté polymicrobienne comprenant *P. aeruginosa* et *A. fumigatus. In vitro,* il a été montré que *P. aeruginosa* induit la production de fusarinine C et triacétylfusarinine C chez *A. fumigatus, via* la sécrétion de phénazines (*e.g.* pyocyanine) [326]. Le mécanisme et le rationnel de cette interaction restent à préciser, et ce d'autant plus que la pyoverdine (sidérophore sécrété par *P. aeruginosa*), grâce à son pouvoir de rétention du fer, joue un rôle majeur dans l'inhibition du biofilm produit par *A. fumigatus* [327].

4.5.2. Rôle de la RIA

Contrairement aux sidérophores, l'inactivation du système RIA (mutant $\Delta ftrA$) ne semble pas affecter la virulence chez *A. fumigatus* [8] (Figure 35). Néanmoins, plusieurs éléments suggèrent que la RIA joue un rôle lors de l'infection : (i) la suppression des sidérophores extracellulaires entraîne une réduction importante mais non-totale de la virulence ; (ii) les gènes de la RIA – tout comme les gènes des sidérophores – sont fortement induits lors d'une infection aspergillaire ; et (iii) l'abrogation simultanée de la RIA et des sidérophores (double mutant $\Delta ftrA \Delta sidA$) empêche toute croissance fongique, celle-ci n'étant restaurée qu'après ajout de sidérophores ou de très fortes concentrations de fer dans le milieu de culture. Par ailleurs, des études ont montré que le système RIA était crucial pour la virulence d'un certain nombre de champignons non-producteurs de sidérophores, dont *C. albicans* et *C. neoformans* [328,329].

4.6. Disponibilité du fer dans la mucoviscidose

Considérant le rôle essentiel du fer chez les microorganismes ainsi que la diversité du microbiote au sein du poumon mucoviscidosique, il nous semble important de faire le point sur le contenu et le niveau de disponibilité du fer dans le contexte particulier de la mucoviscidose.

On a longtemps supposé que le poumon mucoviscidosique constituait un environnement carencé en fer. Cette hypothèse était basée sur les caractéristiques du poumon sain, et plus précisément le liquide de surface tapissant l'épithélium pulmonaire, dans lequel il est établi que le fer est séquestré par les protéines de l'hôte, telles que la lactoferrine, la ferritine et la transferrine [330]. Les résultats de certaines études sur la régulation des gènes d'acquisition du fer chez le principal pathogène de la mucoviscidose, P. aeruginosa, semblent étayer cette affirmation. Cependant, des mesures de la teneur en fer au sein du poumon mucoviscidosique ont abouti à une reconsidération de ce microenvironnement. Il est maintenant clair que les poumons des patients atteints de mucoviscidose ont, en moyenne, un contenu en fer (libre ou lié à des protéines) plus important que celui d'un individu sain [331]. Par exemple, les dosages effectués sur des crachats ont révélé que la concentration en ferritine était jusqu'à 20 fois plus importante chez le patient mucoviscidosique, comparativement aux individus sains [331–333]. Plus récemment, une étude s'est intéressée aux variations du contenu en fer, i.e. fer total et fractions Fe²⁺/Fe³⁺, au cours de l'évolution de la maladie [334]. De façon intéressante, une corrélation positive a été trouvée entre la teneur en Fe^{2+} (mais pas en Fe^{3+}) et la progression de l'atteinte respiratoire. En effet, à un stade avancé de la maladie (VEMS < 40%), la concentration en Fe^{2+} dans les crachats était en movenne de 39 μ M, contre 28 μ M dans les formes modérées (40% \leq VEMS \leq 70%) et 7 μ M dans les formes mineures (VEMS > 70%). Ainsi, dans les formes les plus sévères, le Fe^{2+} représentait au moins 40% du fer total. L'augmentation de l'abondance des ions Fe²⁺ dans les cas de mucoviscidose sévère ou de stade avancé est probablement due à la réduction des ions Fe³⁺ par les superoxydes générés par les neutrophiles et à la stabilisation de la forme ferreuse résultante par : (i) l'augmentation des zones hypoxiques dans certaines parties du poumon ; et (ii) l'acidification du liquide de surface. Ces données révèlent que l'environnement chimique du poumon est en réalité dynamique et évolue par rapport à sa chimie d'oxydoréduction du fer au fur et à mesure que la maladie progresse.

Le fer héminique est une autre source de fer très abondante dans le poumon mucoviscidosique. L'hème devient disponible après son relargage à partir d'hémoglobine, qui intervient suite à l'oxydation du Fe²⁺ coordonné à la protoporphyrine, ou suite à l'action de protéases de l'hôte ou de microorganismes pathogènes [335,336]. L'inflammation chronique qui règne au sein du poumon mucoviscidosique provoque des micro-hémorragies, lesquelles s'intensifient au cours des épisodes d'exacerbations [337]. La disponibilité du fer ferreux et héminique, en particulier dans les stades avancés de la maladie, a des répercussions potentielles sur les mécanismes d'acquisition du fer qu'un agent microbien doit déployer pour coloniser efficacement le poumon. Ce changement dans la compréhension du statut en fer du poumon mucoviscidosique a conduit certains auteurs à proposer que l'environnement pulmonaire faciliterait en fait la croissance des certains pathogènes, comme par exemple *P. aeruginosa* [338].

4.7. Applications médicales des sidérophores

La plupart des infections fongiques constituent encore à ce jour un challenge diagnostique et thérapeutique. Les sidérophores, compte tenu de leur caractère unique (comparativement aux mécanismes d'acquisition du fer chez les mammifères) et de leur rôle majeur dans la physiologie et la virulence fongique, pourraient aider à améliorer la prise en charge diagnostique et thérapeutique de ces infections. Les différentes approches actuellement à l'étude sont illustrées dans la **Figure 36**.





Les différentes approches présentées ici s'appuient sur l'assimilation de sidérophores exogènes via les transporteurs SITs. Ceux-ci permettent l'internalisation spécifique de produits d'intérêt, tels que des radionucléides ou sondes fluorescentes (applications diagnostiques), ou encore des molécules antifongiques (applications thérapeutiques type « cheval de Troie »). Les flèches en pointillées indiquent le remplacement du fer par du gallium-68 ou la conjugaison du sidérophore avec des médicaments antifongiques ou des sondes fluorescentes (sidérophores 'artificiels'). Note : ce schéma ne représente pas la détection de sidérophores naturellement produits in vivo.

4.7.1. Applications diagnostiques

Le diagnostic des infections fongiques invasives repose en partie sur la détection d'antigènes circulants. Les performances de ces biomarqueurs varient en fonction du terrain sous-jacent, du type d'échantillon (sérum, LBA...) et des traitements en cours. Ceci est particulièrement vrai pour les tests de détection de l'antigène aspergillaire (galactomannane), dont la sensibilité est insuffisante chez les patients non-leucémiques ou en cas de traitement antifongique prophylactique ou empirique [340,341].

Plusieurs études ont montré l'intérêt de la détection de la triacétylfusarinine C (TAFC) pour le diagnostic d'aspergillose invasive. Ce composé peut être détecté en quantité significative dans le sérum, le LBA, et même l'urine [342–344]. Dans le LBA, la recherche de TAFC s'est montrée particulièrement utile en combinaison avec le dosage du galactomannane, dont la sensibilité a ainsi pu être améliorée de 15 à 20% selon le seuil utilisé [343]. Le dosage de TAFC dans les urines constitue également une piste prometteuse compte tenu de son

accumulation au niveau vésical et de son caractère non-invasif [344–346]. Par ailleurs, Bertrand *et al.* [347] ont montré que la détection du N^{α} -méthylcoprogène B (sidérophore sécrété par *Scedosporium apiospermum*) dans les crachats de patients mucoviscidosiques pourrait aider au diagnostic de colonisation respiratoire par les espèces du complexe *S. apiospermum*.

L'imagerie médicale tient aussi une place importante dans le diagnostic des infections fongiques. Pourtant, les signes radiologiques sont souvent aspécifiques et donc difficiles à interpréter. Dans ce contexte, l'utilisation de sidérophores en tant que « traceurs » pourrait constituer une option intéressante pour le diagnostic de ces infections. La preuve du concept a été réalisée sur un modèle murin d'aspergillose invasive [348] (Figure 37). L'infection était révélée après injection de TAFC liée à un radionucléide, le gallium-68 (en remplacement du fer). En effet, le chélate ⁶⁸Ga-TAFC s'accumule dans les tissus infectés *via* les transporteurs SITs, et diffuse un signal quasi-spécifique d'*A. fumigatus* qui est l'un des seuls microorganismes capable d'assimiler la TAFC [345]. Récemment, le concept a été étendu aux infections bactériennes, en utilisant d'autres sidérophores tels que la pyoverdine ou la desferrioxamine B [339].



Figure 37. Illuminer les zones infectées grâce aux sidérophores, adapté de Luptáková et al. [349].

Coupes coronales (CT et PET/CT, haut) et images obtenues après modélisation 3D (PET/CT, bas) suite à l'injection intraveineuse de ⁶⁸Ga-TAFC dans un modèle de rat infecté (gauche) ou non-infecté (droite) par A. fumigatus. A noter, l'accumulation du radionucléide au niveau pulmonaire, ce qui facilite grandement la détection du foyer infectieux (flèches jaunes). L'accumulation dans les reins (flèche bleue) est due à l'excrétion rénale du ⁶⁸Ga-TAFC. CT : computed tomography, PET : positron emission tomography.

4.7.2. Applications thérapeutiques

La voie de biosynthèse des sidérophores, absente chez l'hôte mammifère, constitue une cible attrayante pour l'implémentation de thérapies sélectives (et donc non toxiques). A ce titre, la caractérisation structurale de l'enzyme SidA chez *A. fumigatus* pourrait faciliter la conception d'inhibiteurs spécifiques [350]. La recherche est active dans ce domaine, puisqu'une étude très récente a permis d'élucider la dynamique des états conformationnels adoptés par le site actif de SidA au cours de la réaction catalytique [351]. Par ailleurs, l'application topique d'une bi-thérapie à base de défériprone (chélateur du fer) et d'une statine (qui cible à la fois la production des sidérophores extracellulaires et celle des stérols par inhibition de la biosynthèse de mévalonate (Figure 32)) a donné des résultats très prometteurs dans un modèle murin de kératite aspergillaire [352].

Comme vu précédemment, les transporteurs SITs font partie d'une des rares familles de protéines spécifiques du règne fongique [353]. Par conséquent, ils représentent une cible de choix en médiant potentiellement la délivrance de médicaments selon une approche « cheval de Troie » [354], dans laquelle des agents antifongiques sont liés de manière covalente aux sidérophores pour une importation sélective dans les champignons (Figure 36).

Par ailleurs, l'étude des SITs peut permettre d'améliorer la compréhension des mécanismes d'action des nouveaux antifongiques. Récemment, deux études ont montré que le transporteur Sit1 était indispensable pour l'activité du composé VL-2397, un puissant inhibiteur d'*Aspergillus* spp. incluant les souches résistantes aux azolés [355,356]. De façon intéressante, l'expression du gène *sit1* naturellement absent chez *S. cerevisiae* (qui est donc intrinsèquement résistant au VL-2397) a permis d'obtenir un phénotype sensible, suggérant une cible intracellulaire commune [355].

Travail expérimental

La capacité des microorganismes à soustraire le fer pourtant séquestré au sein de leur hôte constitue un élément clé de leur virulence. Nous avons vu précédemment qu'une des stratégies les plus répandues chez les bactéries et les champignons filamenteux consiste en la sécrétion de sidérophores. Ces petites molécules chélatrices de fer jouent un rôle essentiel dans la croissance, l'adaptation au stress oxydatif et l'établissement d'une infection. Si le système sidérophore a été particulièrement bien décrit chez les agents filamenteux (notamment les *Aspergillus* spp.), les données concernant le genre *Scedosporium*, qui constitue le deuxième agent filamenteux rencontré dans le contexte de mucoviscidose, demeuraient très parcellaires au démarrage de cette thèse.

Ainsi, le premier objectif de ce travail a consisté en l'exploration *in silico* du génome de *S. apiospermum,* axée sur les gènes potentiellement impliqués dans la synthèse des sidérophores (en particulier les NRPSs) et d'une façon plus générale dans le métabolisme du fer.

Il convient également de rappeler que la voie des NRPSs, qui n'est pas retrouvée chez les cellules de mammifères, suscite depuis quelques années une attention particulière en tant que nouvelles cibles thérapeutiques potentielles. Compte tenu de (i) l'importance des NRPSs chez d'autres champignons impliqués en médecine humaine, et de (ii) la faible sensibilité naturelle des *Scedosporium* vis-à-vis des antifongiques actuellement disponibles sur le marché [150], nous avons ainsi poursuivi l'analyse bioinformatique en élargissant nos investigations à l'ensemble des clusters de gènes comportant une NRPS au sein du génome de *S. apiospermum*.

Parallèlement, nos expériences de manipulations génétiques nous ont conduits à étudier plus en détail le rôle et l'implication du système sidérophore dans la croissance et la virulence de *S. apiospermum*.

1. Analyse génomique et transcriptomique du métabolisme du fer chez *S. apiospermum*

La première partie de mon travail expérimental a consisté à investiguer la présence de gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de sidérophores et de manière plus générale dans le métabolisme du fer, chez *Scedosporium apiospermum*. La recherche de gènes d'intérêt a été effectuée chez la souche clinique *S. apiospermum* IHEM 14462, dont le génome a été publié en 2014 (Vandeputte *et al.* NW_015971811.1).

Ce travail a donné lieu à une publication dans la revue *Frontiers in Microbiology* en 2018.

1.1. Résumé

La physiopathologie des infections déterminées par les espèces du complexe Scedosporium apiospermum est encore mal connue. La capacité de ces champignons à accéder aux ressources en fer constitue vraisembablement un déterminant important de leur virulence, le fer étant impliqué dans de nombreux processus biologiques essentiels. Comme énoncé précédemment, l'acquisition du fer extracellulaire chez les champignons filamenteux fait appel à deux grands mécanismes : le système d'assimilation réductive (RIA), et la synthèse et la sécrétion de petites molécules chélatrices appelées sidérophores. Afin d'investiguer la présence de gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme du fer chez S. apiospermum, nous avons réalisé une analyse tBLASTn fondée sur la recherche de similarités avec les protéines assurant l'acquisition, le transport et le stockage du fer chez Aspergillus fumigatus. Cette analyse bioinformatique a permis d'identifier 7 orthologues des gènes SID impliqués dans la synthèse de la fusarinine C (sidérophore extracellulaire) et de la ferricrocine (sidérophore intracellulaire) chez A. fumigatus, 1 orthologue de SitT assurant l'efflux de l'apo-sidérophore extracellulaire, 8 gènes codant des transporteurs membranaires de type MFS potentiellement impliqués dans l'assimilation des complexes ferri-sidérophores, et 13 codant des perméases d'ions Fe²⁺ ou Fe³⁺ ou des enzymes potentiellement impliquées dans le processus d'assimilation réductive. Alors que les gènes contrôlant les mécanismes d'assimilation réductive sont répartis de façon hétérogène dans le génome de S. apiospermum, ceux potentiellement impliqués dans la biosynthèse et le transport des sidérophores sont regroupés en deux clusters comprenant chacun un gène NRPS, et dont l'organisation est plus proche de celle observée chez d'autres Sordariomycètes comparés aux Aspergillus.

Le rôle de ces gènes a ensuite été confirmé en étudiant leur niveau d'expression par PCR quantitative après rétrotranscription (RT-qPCR) après culture dans des conditions de carence en fer ou, au contraire, en présence d'un excès de fer. L'expression des orthologues des gènes *SID*, comme de la majorité des gènes codant les transporteurs spécifiques, est fortement induite lors d'une carence martiale. A l'inverse, la plupart de ces gènes sont réprimés en présence d'un excès de fer. Enfin, concernant les mécanismes d'assimilation réductive, nos résultats expérimentaux accréditent le rôle joué par 3 des 13 gènes identifiés *in silico*.

Ce travail montre que *S. apiospermum* possède l'information génétique nécessaire au métabolisme du fer. Des études complémentaires sont toutefois requises pour identifier l'ensemble des sidérophores produits, et déterminer leur contribution respective dans la virulence de *S. apiospermum*.

1.2. Article


ORIGINAL RESEARCH published: 26 April 2018 doi: 10.3389/fmicb.2018.00827



Genomic Organization and Expression of Iron Metabolism Genes in the Emerging Pathogenic Mold Scedosporium apiospermum

Yohann Le Govic^{1,2*}, Nicolas Papon¹, Solène Le Gal^{3,4}, Bénédicte Lelièvre^{1,5}, Jean-Philippe Bouchara^{1,2} and Patrick Vandeputte^{1,2}

¹ Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), SFR ICAT 4208, UNIV Angers, UNIV Brest, Angers, France, ² Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France, ³ Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (EA 3142), SFR ICAT 4208, UNIV Angers, UNIV Brest, Brest, France, ⁴ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Brest, France, ⁵ Laboratoire de Pharmacologie-Toxicologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France

OPEN ACCESS

Edited by:

Joshua D. Nosanchuk, Albert Einstein College of Medicine, United States

Reviewed by:

Tamás Papp, University of Szeged, Hungary Marcio L. Rodrigues, Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), Brazil

> *Correspondence: Yohann Le Govic yohann.legovic@chu-angers.fr

Specialty section:

This article was submitted to Fungi and Their Interactions, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: 22 January 2018 Accepted: 11 April 2018 Published: 26 April 2018

Citation:

Le Govic Y, Papon N, Le Gal S, Lelièvre B, Bouchara J-P and Vandeputte P (2018) Genomic Organization and Expression of Iron Metabolism Genes in the Emerging Pathogenic Mold Scedosporium apiospermum. Front. Microbiol. 9:827. doi: 10.3389/fmicb.2018.00827 The ubiquitous mold Scedosporium apiospermum is increasingly recognized as an emerging pathogen, especially among patients with underlying disorders such as immunodeficiency or cystic fibrosis (CF). Indeed, it ranks the second among the filamentous fungi colonizing the respiratory tract of CF patients. However, our knowledge about virulence factors of this fungus is still limited. The role of iron-uptake systems may be critical for establishment of Scedosporium infections, notably in the iron-rich environment of the CF lung. Two main strategies are employed by fungi to efficiently acquire iron from their host or from their ecological niche: siderophore production and reductive iron assimilation (RIA) systems. The aim of this study was to assess the existence of orthologous genes involved in iron metabolism in the recently sequenced genome of S. apiospermum. At first, a tBLASTn analysis using A. fumigatus iron-related proteins as query revealed orthologs of almost all relevant loci in the S. apiospermum genome. Whereas the genes putatively involved in RIA were randomly distributed, siderophore biosynthesis and transport genes were organized in two clusters, each containing a non-ribosomal peptide synthetase (NRPS) whose orthologs in A. fumigatus have been described to catalyze hydroxamate siderophore synthesis. Nevertheless, comparative genomic analysis of siderophore-related clusters showed greater similarity between S. apiospermum and phylogenetically close molds than with Aspergillus species. The expression level of these genes was then evaluated by exposing conidia to iron starvation and iron excess. The expression of several orthologs of A. fumigatus genes involved in siderophore-based iron uptake or RIA was significantly induced during iron starvation, and conversely repressed in iron excess conditions. Altogether, these results indicate that S. apiospermum possesses the genetic information required for efficient and competitive iron uptake. They also suggest an important role of the siderophore production system in iron uptake by S. apiospermum.

Keywords: Scedosporium, genome mining, iron, siderophore, gene expression

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

INTRODUCTION

Iron is the fourth most common element found on the Earth's crust (Frey and Reed, 2012). However, in spite of its abundance, iron is fairly accessible to living organisms as a result of its very limited solubility under aerobic conditions. Iron is mainly encountered in two relatively stable oxidation states, ferrous (Fe(II) or Fe²⁺) and ferric (Fe(III) or Fe³⁺). Due to the reversible switching between the Fe²⁺ and Fe³⁺ species and its ability to form coordination complexes with organic ligands, iron plays a critical role in numerous biochemical processes including oxidative phosphorylation, DNA replication, and biosynthesis of small molecules such as lipids, amino acids, and sterols (Philpott, 2006). On other hand, iron excess can be harmful to the cell owing to its capacity to catalyze the formation of reactive oxygen species (ROS) and to initiate lipid peroxidation (Halliwell and Gutteridge, 1984). Therefore, microbes have evolved sophisticated systems to overcome suboptimal iron availability and meanwhile to prevent iron overload toxicity.

Four distinct mechanisms of iron acquisition have been described in fungi: (i) heme uptake and degradation, (ii) lowaffinity ferrous iron uptake, which occurs through relatively non-specific divalent cation transporters, (iii) reductive iron assimilation (RIA), employing a high-affinity uptake system in which ferrous iron is first oxidized by a multicopperferroxidase before being transferred to the cytosol via a specific Fe(III)-permease, and (iv) siderophore-mediated iron uptake (Haas, 2014). Siderophores are amongst the strongest natural Fe(III)-chelating products. The majority of fungal siderophores belongs to the hydroxamate class and can be divided into four structural families: rhodotorulic acid, fusarinines, coprogens, and ferrichromes. The hydroxamate functional group is synthesized from L-ornithine, a non-proteinogenic amino acid that is produced either in mitochondria from L-glutamate or in the cytosol through hydrolysis of L-arginine (Schafferer et al., 2015). The first key enzyme of the hydroxamate biosynthetic pathway is the L-ornithine-N⁵-monooxygenase SidA, which catalyzes N⁵-hydroxylation of L-ornithine (Eisendle et al., 2003). The hydroxamate motif is then formed by N^5 acylation of N⁵-hydroxy-L-ornithine by N⁵-transacylases. Here, the pathway splits as different acyl groups can be attached to hydroxyornithine, defining the nature of the siderophore produced. In Aspergillus fumigatus, this step is mediated by two transacetylases: SidL, which adds an acetyl group in ferrichrometype siderophores (Blatzer et al., 2011c), and SidF, which adds an anhydromevalonyl group in siderophores of the coprogen and fusarinine families (Schrettl et al., 2007). Anhydromevalonyl-CoA is obtained from mevalonate by consecutive CoA-ligation and dehydration catalyzed by the peroxisomal enzymes SidI and SidH, respectively (Yasmin et al., 2012; Gründlinger et al., 2013). The ultimate step consists in the covalent linkage of the N^5 acyl-N⁵-hydroxy-L-ornithine groups, and is orchestrated by nonribosomal peptide synthetases (NRPSs). After being activated by a 4'-phosphopantetheinyltransferase protein (NpgA/PptA), the NRPSs SidC and SidD achieve assembly of intra- and extracellular siderophores in A. fumigatus, respectively (Schrettl et al., 2007). Excreted siderophores bind Fe(III) ions to form

Iron Metabolism Genes in Scedosporium apiospermum

ferrisiderophores chelates, which are then imported into the cell through specific plasma membrane-localized transporters termed "siderophore-iron transporters" (SITs). At least two types of SITs have been identified in the aspergilli, including *Aspergillus* SitT and MirA-D proteins, which belong to the ATP-binding cassette and major facilitator superfamilies, respectively (Haas et al., 2003; Schrettl et al., 2008, 2010). Once entered into the cytoplasm, iron is released from siderophores and finally becomes available for various cellular processes.

In addition to the non-reductive siderophore-mediated iron acquisition, pathogenic fungi developed a reductive, nonchelating high affinity iron uptake system called "reductive iron assimilation" (RIA). RIA necessitates the reduction by a ferric reductase (Fre family) of highly insoluble ferric iron to more soluble and bioavailable ferrous iron, combined with a specific transport system composed of a multicopper ferroxidase (Fet family) associated with a ferric permease (Ftr family) (Kosman, 2013). The Fet and Ftr proteins are inextricably linked together since they are assembled into a stable complex prior to plasma membrane trafficking (Stearman et al., 1996). Indeed, the Fetmediated Fe(II) oxidation step is mandatory to the permeation step, i.e., the Ftr channel only accepts Fe(III) generated by the coupling Fet protein (Wang et al., 2003). Unlike Cryptococcus neoformans and Candida albicans ferric permeases, A. fumigatus FtrA has been demonstrated to be dispensable for fungal virulence, in the presence of a functional siderophore iron uptake system (Ramanan and Wang, 2000; Schrettl et al., 2004; Jung et al., 2008). Furthermore, ferric reductases play an important role in the removal of iron from siderophores (Yun et al., 2001) or from host iron sources, such as heme and transferrin (Knight et al., 2005; Saikia et al., 2014).

In A. fumigatus, optimal iron balance is maintained by two central regulatory proteins, which are interconnected in a negative feedback loop: the GATA-transcription factor SreA and the bZIP-transcription factor HapX (Haas, 2014). During iron starvation, HapX represses iron-consuming pathways (e.g., heme biosynthesis and respiration) and activates siderophore production through interaction with the CCAAT-binding complex (CBC). On the other hand, during iron sufficiency, SreA down-regulates both RIA and siderophore uptake systems via binding to the consensus DNA sequence ATCWGATAA. The disruption of hapX, but not of sreA, was shown to impair virulence of A. fumigatus in murine models of invasive aspergillosis (Schrettl et al., 2008, 2010). These observations highlight the need to adapt to iron limitation for establishing fungal infection, which is consistent with the fact that intraand extracellular siderophores play a pivotal role in A. fumigatus virulence (Schrettl et al., 2007).

Scedosporium apiospermum is a ubiquitous fungus capable of causing a wide range of infections in human (Cortez et al., 2008). Despite numerous studies showing an increasing health threat, especially among patients with underlying conditions (e.g., immunodeficiency or cystic fibrosis) (Walsh and Groll, 1999; Guarro et al., 2006; Lamaris et al., 2006; Pihet et al., 2009; Douglas et al., 2016; Koehler et al., 2016; Chen et al., 2017), little is known about virulence factors enabling the fungus to produce acute or chronic infections. Moreover, *Scedosporium*

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

infections are extremely difficult to treat due to the high level of intrinsic resistance to many, if not all, of current antifungals (Cortez et al., 2008). To gain insight into the pathogenic and drug resistance mechanisms of this fungus, the genome of a clinical isolate of *S. apiospermum* was fully sequenced in 2014 (Vandeputte et al., 2014). Here, we describe the first genomic and transcriptional analysis focusing on genes related to iron metabolism in *S. apiospermum*.

MATERIALS AND METHODS

Strain and Culture Conditions

Scedosporium apiospermum (S. apiospermum; taxid:563466) whole-genome sequenced strain IHEM 14462, originally isolated from a sputum sample from a cystic fibrosis patient (Vandeputte et al., 2014), was grown on Potato Dextrose Agar (Conda, Madrid, Spain) plates at 37°C for 9 days to induce sporulation. Conidia were harvested from colonies by aseptically scraping the plates using 1X TE buffer (10 mM Tris(hydroxymethyl)aminomethane, HCl pH 7.5, 1 mM EDTA NaOH pH 8) and passing through Miracloth® mesh filter (Merck, Darmstad, Germany) to remove the mycelia. The filtrate was centrifuged (4,600 rpm, 5 min) and pelleted conidia were resuspended in 1X TE buffer. Conidia were numbered with a hemocytometer and a total of 10⁷ conidia were inoculated into 100-ml flasks containing 25 ml of YEPD medium (containing per liter: 5 g yeast extract, 10 g peptone, 20 g dextrose, and 0.5 g chloramphenicol). Cultures were incubated for 48 h at 37°C with agitation (120 rpm). Iron excess was obtained by supplementing YEPD medium with 20 µM of either free (FeSO4 or FeCl₃) or transferrin-bound iron (holotransferrin, Thermo Fisher, Karlsruhe, Germany). Iron-depleted conditions were obtained by adding 200 µM bathophenanthroline disulfonate (BPS, Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) in YEPD medium.

Genome Mining

Identification of S. apiospermum genes potentially involved in iron metabolism was performed as described by Haas (Haas, 2012), searching for orthologs of A. fumigatus strain Af293 (A. fumigatus; taxid:330879) iron-related proteins through tBLASTn analysis (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) against S. apiospermum genome. Only results corresponding to strain IHEM 14462 with an e-value < 1e-15 on at least 40% of the query sequence were considered. Organization into clusters of the genes found in S. apiospermum genome was further compared with those identified in the genomes of A. fumigatus strain Af293 (Nierman et al., 2005), A. nidulans strain FGSC A4 (taxid:227321) (Galagan et al., 2005), A. niger strain CBS 513.88 (taxid:425011) (Pel et al., 2007), Colletotrichum higginsianum strain IMI 349063 (taxid:759273) (O'Connell et al., 2012) and Trichoderma reesei strain QM6a (taxid:431241) (Martinez et al., 2008). Searching for putative binding sites of the transcription factor HapX (Hortschansky et al., 2007) was performed within the 2 kb upstream region of each gene putatively involved in RIA and siderophore metabolism by using the MEME Suite's FIMO (Grant et al., 2011).

RNA Isolation, Retrotranscription and Real-Time Quantitative PCR

Fungal cells from triplicate cultures in standard, iron-overloaded and iron-depleted conditions were harvested at 48 h and ground in liquid nitrogen with a mortar and pestle. Total RNA was recovered by processing the fungal powder with the NucleoSpin[®] RNA Plant kit (Macherey-Nagel, Düren, Germany), according to the manufacturer's instructions. All RNA samples (5 μ g) were treated with 2 U of RNase-free DNase I (AmbionTM Life Technologies, Carlsbad, CA), according to the protocol supplied by the manufacturer. Complementary DNA were synthesized from 500 ng total RNA using SuperScript IV reverse transcriptase (200 U; Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) in the presence of oligo-d(T) primer $(2.5 \,\mu M)$, deoxyribonucleoside triphosphates (0.5 mM each), dithiotreitol (5 mM), and RNase inhibitor (2 U). Thereafter, cDNA were 20fold diluted and used as template for real-time quantitative PCR (qPCR). Each reaction (12.5 µl final volume) contained Fast SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 200 nM of each primer (Integrated DNA Technologies Inc., Leuven, Belgium), and 1 µl of diluted cDNA. Primers used to perform qPCR experiments are compiled in Supplementary Table S1. qPCR reactions were carried out on a StepOnePlusTM thermocycler (Applied Biosystems) with the following thermal profile: 95°C for 2 min, 40 cycles of 95°C for 3 s, 60°C for 30 s. Melting curve analysis was performed immediately after the amplification procedure as follows: 95°C for 15 s, and stepwise annealing from 60 to 94.9°C with 0.3°C increments. For each gene, fold changes relative to standard condition (i.e., YEPD medium) were calculated in each condition using the deltadelta Ct method and ubcB and sarA genes as endogenous controls (Llanos et al., 2015). For each data point, three biological replicates and two technical replicates were performed, and the variation in expression of a given gene was considered significant if the log2 fold change \pm standard deviation was > 1 or < -1.

RESULTS

Genome Mining for Iron Homeostasis in Scedosporium apiospermum

Computational identification of genes putatively involved in iron metabolism in S. apiospermum was performed through a tBLASTn analysis, using A. fumigatus Af293 iron-related proteins as query (Haas, 2012). This strategy allowed to find orthologs of all genes involved in iron acquisition and storage (Table 1), with the exception of srbA, which encodes a regulatory protein that activates iron uptake during iron deprivation (Blatzer et al., 2011a), sidG, which encodes a protein that catalyzes fusarinine C esterification, and estB and sidJ, which both encode proteins involved in triacetylfusarinine C saponification (Kragl et al., 2007; Schrettl et al., 2007). Furthermore, this analysis revealed that S. apiospermum genome contains two putative gene clusters harboring an iron-related NRPS as the core member (Figure 1). Indeed, the closest orthologs of these NRPS genes, *sidC* and *sidD*, are known or presumed to be involved in siderophore synthesis in A. fumigatus (Haas, 2012), A. nidulans (von Döhren, 2009),

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

Iron Metabolism Genes in Scedosporium apiospermum

TABLE 1 | Results of tBLASTn analysis of the genes putatively involved in iron metabolism in S. apiospermum against A. fumigatus Af293 (taxid: 330879).

Protein	Function	A. fumigatus coding sequence	S. apiospermum ortholog (E-value/max identity compared with A. fumigatus protein)	Query cover(%)	S. apiospermum encoded protein (Genbank accession number)
SIDERO	PHORE BIOSYNTHESIS				
SidA	L-ornithine-N ⁵ - monooxygenase	AFUA_2G07680	SAPIO_CDS9033 (3e-112/52%)	90	KEZ40036.1
SidC	NRPS ferricrocin	AFUA_1G17200	SAPIO_CDS9032 (0.0/26%)	94	KEZ40035.1
SidD	NRPS fusarinine C	AFUA_3G03420	SAPIO_CDS2806 (0.0/44%)	88	NW_015971788.1*
SidF	Hydroxyornithine transacylase	AFUA_3G03400	SAPIO_CDS2803 (6e-125/47%)	88	NW_015971788.1*
SidG	Transacetylase	AFUA_3G03650	Ø		
SidH	Mevalonyl-CoA hydratase	AFUA_3G03410	SAPIO_CDS2272 (4e-80/48%)	97	NW_015971787.1*
Sidl	Mevalonyl-CoA ligase	AFUA_1G17190	SAPIO_CDS2805 (2e-143/64%)	96	KEZ44717.1
SidL	Transacetylase	AFUA_1G04450	SAPIO_CDS2796 (7e-120/42%)	100	KEZ44711.1
EstB	Triacetylfusarinine C esterase	AFUA_3G03660	Ø		
SidJ	Lipase/Esterase	AFUA_3G03390	Ø		
PptA	Phosphopantetheinyl transferase	AFUA_2G08590	SAPIO_CDS5197 (3e-26/31%)	74	KEZ42787.1
AgaA	Arginase	AFUA_3G11430	SAPIO_CDS10183 (5e-153/64%)	98	KEZ38874.1
AmcA	Mitochondrial ornithine carrier protein	AFUA_8G02760	SAPIO_CDS3378 (6e-87/48%)	92	KEZ44391.1
SIDERO	PHORE TRANSPORT SYS	STEMS			
MirB	MFS transporter	AFUA_3G03640	SAPIO_CDS2478 (1e-153/57%)	88	KEZ45056.1
			SAPIO_CDS2804 (4e-105/37%)	87	NW_015971788.1*
			SAPIO_CDS9285 (2e-87/36%)	83	KEZ40224.1
			SAPIO_CDS4564 (4e-84/35%)	83	KEZ43394.1
			SAPIO_CDS4736 (2e-51/32%)	85	KEZ43292.1
			SAPIO_CDS5249 (2e-46/26%)	87	NW_015971799.1*
			SAPIO_CDS6391 (6e-37/32%)	46	KEZ41999.1
			SAPIO_CDS1833 (9e-35/30%)	62	NW_015971778.1*
MirC	MFS transporter	AFUA_2G05730	SAPIO_CDS2804 (2e-52/28%)	82	NW_015971788.1*
			SAPIO_CDS5249 (1e-48/27%)	82	NW_015971799.1*
			SAPIO_CDS4564 (6e-48/28%)	79	KEZ43394.1
			SAPIO_CDS9285 (1e-46/26%)	93	KEZ40224.1
			SAPIO_CDS1833 (9e-39/28%)	64	NW_015971778.1*
			SAPIO_CDS6391 (2e-38/30%)	63	KEZ41999.1
			SAPIO_CDS2478 (4e-22/28%)	78	KEZ45056.1
			SAPIO_CDS4736 (1e-19/27%)	41	KEZ43292.1
MirD	MFS transporter	AFUA_3G03440	SAPIO_CDS2478 (2e-137/46%)	88	KEZ45056.1
			SAPIO_CDS2804 (2e-93/33%)	92	NW_015971788.1*
			SAPIO_CDS9285 (4e-88/32%)	96	KEZ40224.1
			SAPIO_CDS4564 (2e-80/35%)	85	KEZ43394.1
			SAPIO_CDS4736 (3e-37/32%)	90	KEZ43292.1
			SAPIO_CDS5249 (6e-34/24%)	94	NW_015971799.1*
			SAPIO_CDS6391 (2e-24/29%)	53	KEZ41999.1
			SAPIO_CDS1833 (2e-22/24%)	61	NW_015971778.1*
SitT	ABC transporter	AFUA_3G03430	SAPIO_CDS2801 (0.0/48%)	99	KEZ44715.1
CccA	Vacuolar iron	AFUA_4G12530	SAPIO_CDS5446 (1e-57/43%)	68	KEZ42991.1

(Continued)

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

April 2018 | Volume 9 | Article 827

Iron Metabolism Genes in Scedosporium apiospermum

Le Govic et al.

TABLE 1 | Continued

Protein	Function	A. fumigatus coding sequence	S. apiospermum ortholog (E-value/max identity compared with A. fumigatus protein)	Query cover(%)	S. apiospermum encoded protein (Genbank accession number)
REGULA	TORY PROTEINS				
AcuM	Zn2Cys6 transcription factor	AFUA_2G12330	SAPIO_CDS0915 (7e-79/48%)	65	KEZ46068.1
MpkA	MAP kinase A	AFUA_4G13720	SAPIO_CDS2689 (1e-162/73%)	99	KEZ45223.1
PacC	Cys2His2 transcription factor	AFUA_3G11970	SAPIO_CDS0213 (5e-42/66%)	69	KEZ46879.1
SreA	ZnF_GATA transcription factor	AFUA_5G11260	SAPIO_CDS7310 (1e-34/39%)	40	KEZ41223.1
SrbA	bHLH transcription factor	AFUA_2G01260	Ø		
НарХ	bZip transcription factor	AFUA_5G03920	SAPIO_CDS9738 (8e-22/30%)	49	NW_015971844.1*
REDUCT	TIVE IRON ASSIMILATION				
FreB	Ferric reductase	AFUA_1G17270	SAPIO_CDS2383 (5e-67/38%)	75	KEZ44995.1
			SAPIO_CDS1476 (1e-46/28%)	69	KEZ45701.1
			SAPIO_CDS9014 (2e-39/30%)	48	KEZ40025.1
			SAPIO_CDS10508 (4e-37/23%)	69	KEZ39117.1
			SAPIO_CDS10060 (4e-30/24%)	70	NW_015971855.1*
			SAPIO_CDS9433 (1e-28/26%)	56	KEZ39544.1
			SAPIO_CDS5404 (7e-24/24%)	69	KEZ42955.1
			SAPIO_CDS6952 (2e-17/26%)	49	NW_015971810.1*
			SAPIO_CDS10726 (2e-17/23%)	41	KEZ38703.1
FetC	Multicopper ferroxidase	AFUA_5G03790	SAPIO_CDS0314 (2e-103/55%)	96	KEZ46527.1
			SAPIO_CDS8659 (1e-62/51%)	87	KEZ40718.1
			SAPIO_CDS0322 [#] (0.0/54%) ^{\$}		KEZ46534.1
FtrA	Iron permease	AFUA_5G03800	SAPIO_CDS0321 (3e-95/52%)	94	KEZ46533.1
			SAPIO_CDS0315 [#] (2e-107/49%) ^{\$}		KEZ46528.1

*Accession number of the contig since the corresponding CDSs are considered as pseudogenes in the draft genome sequence of S. apiospermum; Ø, not present or score below thresholds (e-value: 1e-15, query cover: 40%); #, putative orthologs detected through blastP analysis against fungi (taxid:4751); \$, best scores obtained with blastP against Aspergillus furnigatus Af293.

and *A. niger* (Franken et al., 2014). In *S. apiospermum*, the *sidC*-related cluster contains an ortholog of *sidA*, which controls the initiation step of fungal hydroxamate siderophore biosynthesis (Eisendle et al., 2003). The second cluster is a combination made up of six genes putatively involved in siderophore production (i.e., *sidD*, *sidF*, *sidI*, and *sidL* orthologs) and transport (i.e., one *sitT* and one *mir* orthologs). The *sidH* ortholog is located in a different region of the genome together with a putative MFS transporter gene (CDS2271), and is separated from the *sidD* cluster by 110 kb. Data mining also revealed the existence of 7 other *mir* orthologs randomly distributed within *S. apiospermum* genome.

Of note, we found that the *S. apiospermum sidL* gene was not correctly annotated (**Figure 2**). Indeed, this coding region (CDS2796) is made of three exons – E1 (1,469 bp), E2 (600 bp), and E3 (277 bp) – and two introns – I1 (783 bp) and I2 (73 bp) – while in *A. fumigatus* and *A. nidulans, sidL* gene contains only 2 exons (~1,400 and 120 bp, respectively) separated by a ~50 bp intron. In other words, the *S. apiospermum sidL* ORF is twice longer than its *Aspergillus* orthologs, partly due to a long first intron. Interestingly, a Pfam analysis (http://pfam.xfam. org/) of the deduced protein sequence identified two conserved motifs in CDS2796: an acetyltransferase (GNAT) domain as expected for *sidL*, but also a cytochrome heme lyase domain. This discrepancy led us to refine the analysis of CDS2796 sequence which revealed the presence of previously undetected exonintron boundaries, one located at the 3' end of E1, and another 96 bp away (i.e., inside I1), from which the transcription of a 120 bp supplementary exon occurs. The size of the mRNA transcribed from CDS2796 was further confirmed experimentally by designing 3 pairs of primers (Figure 2A). The first pair spans the newly discovered intron, and a PCR performed on cDNA with these primers amplified an expected 123 bp-fragment, which confirms the existence of this predicted intron (Figure 2B). The second pair of primers was designed to cover the last intron, and also amplified a fragment of the expected size. On the opposite, the third pair of primers, covering CDS2796 from start to stop codons as automatically annotated, gave no amplification, further confirming that the transcription of CDS2796 produces two mRNAs, the most upstream corresponding to a sidL ortholog, in

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

Iron Metabolism Genes in Scedosporium apiospermum



agreement with the sequence of this protein in *Aspergillus* species. The annotation of the contig containing the *S. apiospermum sidL* gene (GenBank accession number NW_015971788.1) has been updated accordingly.

Aside from siderophore-mediated iron acquisition gene battery, the tBLASTn analysis allowed the detection of several genes putatively involved in RIA. Indeed, two *A. fumigatus fetC* and one *ftrA* orthologs were identified in *S. apiospermum*. The *fetC* ortholog displaying the lowest similarity (CDS8659) with *A. fumigatus* has no iron-related genes in its vicinity; however, this ORF is clustered with genes involved in melanin biosynthesis, which requires the action of multicopper oxidases belonging to the laccases subfamily. These enzymes catalyze the oxidation of phenolic compounds that simultaneously converts Fe(III) to Fe(II), suggesting rather a role for CDS8659 in melanin production through a laccase (Fe(III)-reducing) activity. The two others *fetC/ftrA* putative orthologs (CDS0314 and CDS0321, respectively) are separated by about 28 kb. However, in fungi, these proteins are classically encoded by paired consecutive genes oriented on the opposite strand one from another (Kensche et al., 2008). The genes neighboring CDS0314 and CDS0321 therefore were analyzed through a BLASTp analysis against fungal genomic resources (taxid:4751). This allowed the identification of CDS0322 as a *fetC* ortholog, paired with the *ftrA* ortholog CDS0314, thus revealing the

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org



same tandem organization in *S. apiospermum*,. None of the nine putative ferric reductases identified in the *S. apiospermum* genome was located in the vicinity of these two Ftr/Fet couples.

Transcriptional Response According to Iron Availability

To assess whether the genes predicted *in silico* were actually involved in iron homeostasis, we studied their expression in *S. apiospermum* cells grown for 48 h in iron starvation or iron excess conditions by qPCR (**Figure 3**). Globally, the variations of expression level observed in iron excess conditions were not influenced significantly by the source of iron (FeCl₃, FeSO₄ or holotransferrine).

- (i) Siderophore biosynthesis. The expression of siderophore biosynthesis-encoding genes, especially those involved in extracellular siderophore production (i.e., sidA, sidD, sidF, sidH, and sidI orthologs), was highly induced under iron deprivation. By contrast, the genes involved in intracellular siderophore synthesis, i.e., sidC and sidL orthologs, as well as the putative pptA gene, which encodes a protein required for NRPSs activation (Allen et al., 2011), remained isoexpressed in our conditions. Besides, all of the siderophore genes that were overexpressed in iron-starved mycelia were down-regulated during iron excess, except for the sidH ortholog, which remained up-regulated.
- (ii) Ornithine metabolism. In S. apiospermum, the gene encoding the putative mitochondrial ornithine transporter amcA was up-regulated during iron starvation; by contrast, the arginase-encoding gene was barely expressed in all culture conditions tested. These results suggest that the cytosolic pool of ornithine is mainly fueled by mitochondria in S. apiospermum.

- (iii) Ferrisiderophores transport. As aforementioned, the S. apiospermum genome encodes a single sitT and 8 mir orthologs. In our conditions, the sitT ortholog and 3 out of 8 mir orthologs (CDS2478, 4564, and 4736) were upregulated during iron starvation. Moreover, the expression of these four loci was downregulated in iron excess conditions, strongly suggesting their involvement in siderophore-mediated iron uptake. Two other mir orthologs, CDS6391 and CDS9285, were strongly downregulated in iron-overloaded conditions. However, the increase in their expression level was not statistically significant during iron starvation (log2 fold-change \pm standard deviation: 0.33 \pm 0.50 and 1.06 \pm 0.56 for CDS6391 and CDS9285, respectively).
- (iv) Reductive iron assimilation. Among the 9 putative ferric reductases found in the S. apiospermum genome, only the ortholog with the highest similarity to the A. fumigatus freB gene (CDS2383) was significantly down-regulated in iron-overloaded culture conditions. Four genes (CDS1476, 9014, 10508, and 10726) were not significantly expressed in any of the conditions tested, while another (CDS6952) was overexpressed under all assayed conditions. Moreover, only the RIA gene couple that displays the highest homology with the A. fumigatus fetC/ftrA gene cluster (CDS0314-0315) was induced under iron starvation. Besides, the ORF hypothesized to encode a laccase-type multicopper oxidase (CDS8659) was, as expected, unresponsive to all tested conditions.
- (v) Vacuolar iron storage. Vacuolar sequestration probably occurs in S. apiospermum since the cccA homolog, which encodes a vacuolar iron importer in A. fumigatus (Gsaller et al., 2012), was significantly overexpressed during iron excess, while its expression remained unchanged under iron deprivation.

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

Iron Metabolism Genes in Scedosporium apiospermum



DISCUSSION

Iron is known to be metabolically essential for virtually all living organisms. Therefore, the "battle for iron" between a given pathogen and the host, but also between several pathogens coexisting within the same host (e.g., *A. fumigatus* and *Pseudomonas aeruginosa* in the CF lung), is a key determinant for a successful infection. To circumvent host-iron withholding, a number of bacterial and fungal pathogens have developed highaffinity iron uptake systems, some of which being mandatory for full virulence. Here, we investigated the presence of iron-related genes in *S. apiospermum* genome in order to find molecular mechanisms potentially underpinning pathogenicity.

The automated *in silico* analysis of *S. apiospermum* genome mis-annotated intronless genes as pseudogenes. Therefore the identification of genes putatively involved in iron metabolism was performed through a tBLASTn rather than a BLASTp analysis, using *A. fumigatus* Af293 iron-related proteins as query (Haas, 2012). This approach allowed to find orthologs for almost all genes involved in iron homeostasis in *A. fumigatus*. Furthermore, data mining revealed that most of the genes required for hydroxamate siderophore biosynthesis and

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

transport were clustered in S. apiospermum. Such genomic organization has already been described in various filamentous fungi (Haas et al., 2008; Franken et al., 2014), but differs from one species to another (Figure 1). For instance, three distinct clusters have been identified in A. fumigatus and A. nidulans (Haas, 2012), whereas only two clusters are described in A. niger (Franken et al., 2014). One of these clusters contains sidC and sidI and seems to be preserved among the aforementioned three Aspergillus species. Interestingly, in S. apiospermum, the sidC-related cluster contains an ortholog of sidA instead of sidI (a feature also found in T. reesei and C. higginsianum), while sidA gene is not clustered in Aspergillus genomes. As for S. apiospermum sidI ortholog, it belongs to another cluster containing a series of genes putatively involved in siderophore biosynthesis (i.e., sidD, sidF, and sidL orthologs) and uptake (i.e., one sitT and one mir orthologs). In Aspergillus species, the sidD-related cluster also includes sidH, while in S. apiospermum the sidH ortholog is located in a different region of the genome together with a putative MFS transporter gene, and is separated from the sidD cluster by 110kb. Moreover, like sidA, sidL genes are not clustered with other siderophore-biosynthetic genes in Aspergillus genomes. Overall, comparative genomics showed that the S. apiospermum siderophore genes were organized as described in most of the siderophore-producing fungi including the aspergilli. Nevertheless, gene clustering in S. apiospermum was more similar to that observed in phylogenetically close phytopathogenic or mycoparasitic molds

such as C. higginsianum and T. reesei. Further analysis of the two S. apiospermum siderophoreassociated NRPS genes showed that the sidD ortholog encodes a protein with 44-45% sequence similarity with those produced by the three above-mentioned Aspergillus species. However, the precise structure of the synthesized metabolite could not be predicted on the single basis of the NRPS sequence. Indeed, although A. fumigatus and A. niger SidD are closely related (66% identity), A. fumigatus produces the extracellular siderophore fusarinine C, while A. niger synthesizes coprogen B (Franken et al., 2014). Besides, one of the closest ortholog of A. fumigatus SidD in non-Aspergillus species is found in Metarhizium robertsii. It displays 58% identity with S. apiospermum SidD ortholog and is involved in the biosynthesis of another coprogentype siderophore termed N^{α} -dimethyl coprogen (Giuliano Garisto Donzelli et al., 2015). We previously demonstrated that S. apiospermum is able to synthesize and secrete the coprogen-type siderophore N^{α} -methyl coprogen B (Bertrand et al., 2009). HPLC-MS also evidenced that S. apiospermum produces the dihydroxamate dimerumic acid, but its involvement in iron metabolism is controversial since it is both described as a breakdown product of coprogen and as a natural product of several molds like Verticillium dahliae or Penicillium chrysogenum (Donzelli and Krasnoff, 2016). Together, these data suggest that *sidD* is responsible for the biosynthesis of N^{α} -methyl coprogen B in S. apiospermum.

Likewise, the prediction of the final non-ribosomal peptide synthesized by sidC orthologs is hazardous, if not impossible. For instance, experimental studies showed that despite the high degree of similarity existing among sidC within the *Aspergillus*

Iron Metabolism Genes in Scedosporium apiospermum

genus, the most likely intracellular siderophore produced by *A. niger* is ferrichrome (Franken et al., 2014), while *A. fumigatus* and *A. nidulans* both synthesize ferricrocin (Haas et al., 2008). Until now, only extracellular siderophores have been identified in *S. apiospermum*. Nevertheless, ferricrocin has been detected in the closely related species *S. boydii* (Vladimír Havlíček, personal communication), in which the putative *sidC* gene encodes a protein that shares 93% identity with XP_016639834.1 encoded by *S. apiospermum sidC* ortholog (CDS9032). Thus, even if mass-spectrometry analyses are needed, it is highly probable that *S. apiospermum* also produces ferricrocin.

Expression data showed that the S. apiospermum genes involved in extracellular siderophores biosynthesis (i.e., sidA, sidD, sidF, sidH, and sidI orthologs) were significantly induced during iron starvation. Conversely, expression of the genes specifically implicated in intracellular siderophores production, i.e., sidC and sidL orthologs, as well as the NRPS activator gene pptA, remained stable in this condition. The last 2 genes are known to be constitutively expressed in A. fumigatus (Oberegger et al., 2003; Blatzer et al., 2011c). More surprising is the unchanged expression level of the *sidC* ortholog, since previous studies based on Northern-blot analyses in Aspergillus showed that transcription of this gene was detectable only during iron starvation (Oberegger et al., 2002; Eisendle et al., 2003; Schrettl et al., 2007). However, more recent studies showed that sidC expression is only weakly affected by low iron concentrations (i.e., ≤20 µM) in both Aspergillus and non-Aspergillus species (Reiber et al., 2005; López-Berges et al., 2012; Franken et al., 2014). The iron concentration in our experimental conditions (20 μ M) could be insufficient to induce significant overexpression of sidC. Likewise, compared to Aspergillus species, S. apiospermum is a slow-growing fungus and one can hypothesize that sidC overexpression is time-delayed in this species. On the other hand, all siderophore genes that were overexpressed in iron starved mycelia were down-regulated during iron excess, except for the *sidH* ortholog, which remained up-regulated. Given that the sidH-encoded enoyl-CoA hydratase catalyzes a reversible reaction (Abdel-Mawgoud et al., 2013), one may speculate that its overexpression in iron excess may help to drop off the peroxisomal pathway and to diminish the production of extracellular siderophores in iron-rich environments.

Among the 9 putative SIT (1 sitT and 8 mir) orthologs found in S. apiospermum genome, one mir ortholog (CDS2804) and the *sitT* ortholog (CDS2801) are part of the *sidD*-related cluster, a feature also observed in Aspergillus spp. and T. reesei. The expression of the S. apiospermum putative sitT and of 3 out of the 8 mir orthologs (CDS2478, CDS4564, and CDS4736) varies with iron availability, indicating that they probably participate in ferrisiderophore uptake. Strikingly, the mir ortholog belonging to the sidD cluster, as well as the four remaining genes, was not statistically overexpressed under iron depletion. In A. fumigatus, iron starvation induces iron-related genes transcription by the recruitment of the HapX transcription factor at CCAAT sequences present in their promoter, through the interaction of HapX with the CCAAT-binding complex (CBC) (Hortschansky et al., 2007). Promoter analysis of four SIT encoding genes responsive to iron starvation (CDS2801, 2478, 4564, 4736)

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

revealed the presence of 3 to 5 CCAAT motifs while only one CCAAT motif was found in the promoter of the unresponsive transporter gene CDS2804 (Supplementary Table S2). Thus, we first hypothesized that the level of expression of SIT genes could be related to the number of CCAAT motifs present in their promoter. Nevertheless, we also found 2 to 5 CCAAT motifs in the promoter of *mir* orthologs unresponsive to iron starvation (CDS1833, 5249, 6391, and 9285). Of note, 3 out of these 4 Mir-encoding genes (CDS1833, 6391, and 9285) belong to gene clusters also organized around some NRPS encoding genes (CDS1828, 6390 and 9291, respectively), but totally unrelated to iron metabolism (unpublished results). The absence of induction of the *mir* orthologs CDS2804 and 5249 remains to be explained.

Despite an apparent expansion of the gene set putatively involved in RIA (n = 14), only three (CDS2383, 0314, and 0315) showed adequate response to the tested conditions, i.e., up-regulation during iron starvation and/or down-regulation during iron excess. RIA is a tripartite system made of one metalloreductase associated with a ferroxidase/ferripermease tandem. Aspergillus fumigatus genome harbors 15 putative metalloreductase genes, but only one, namely freB, is involved in iron metabolism (Blatzer et al., 2011b). Transcriptional analysis showed that the expression of *freB* was repressed by the GATA transcription factor SreA during iron sufficiency. Interestingly, the only putative S. apiospermum ferric-reductase gene that was down-regulated by iron corresponded to the best hit with the A. fumigatus ortholog (CDS2383). Likewise, only the RIA gene cluster showing the highest degree of homology with the A. fumigatus fetC/ftrA gene pair was significantly overexpressed during iron starvation (CDS0314/CDS0315). Of note, two FetC/FtrA homologs with distinct functions are described in the yeast Saccharomyces cerevisiae; indeed the Fet3p/Ftr1p complex mediates Fe(III) channeling in the yeast plasma membrane, while the paralog Fet5p/Fth1p complex mediates iron moves from the yeast vacuole (Urbanowski and Piper, 1999). Consequently,

REFERENCES

- Abdel-Mawgoud, A. M., Lépine, F., and Déziel, E. (2013). A chiral highperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the stereospecific analysis of enoyl-coenzyme A hydratases/isomerases. J. Chromatogr. A 1306, 37–43. doi: 10.1016/j.chroma.2013.07.049
- Allen, G., Bromley, M., Kaye, S. J., Keszenman-Pereyra, D., Zucchi, T. D., Price, J., et al. (2011). Functional analysis of a mitochondrial phosphopantetheinyl transferase (PPTase) gene pptB in Aspergillus fumigatus. Fungal Genet. Biol. 48, 456–464. doi: 10.1016/j.fgb.2010.12.006
- Bertrand, S., Larcher, G., Landreau, A., Richomme, P., Duval, O., and Bouchara, J. P. (2009). Hydroxamate siderophores of *Scedosporium apiospermum. Biometals* 22, 1019–1029. doi: 10.1007/s10534-009-9253-0
- Blatzer, M., Barker, B. M., Willger, S. D., Beckmann, N., Blosser, S. J., Cornish, E. J., et al. (2011a). SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen Aspergillus fumigatus. PLoS Genet. 7:e1002374. doi: 10.1371/journal.pgen.1002374
- Blatzer, M., Binder, U., and Haas, H. (2011b). The metalloreductase FreB is involved in adaptation of *Aspergillus fumigatus* to iron starvation. *Fungal Genet. Biol.* 48, 1027–1033. doi: 10.1016/j.fgb.2011.07.009
- Blatzer, M., Schrettl, M., Sarg, B., Lindner, H. H., Pfaller, K., and Haas, H. (2011c). SidL, an *Aspergillus fumigatus* transacetylase involved in biosynthesis of the

Iron Metabolism Genes in Scedosporium apiospermum

one may hypothesize that the non-responsive *S. apiospermum fetC/ftrA* gene cluster is involved in vacuolar trafficking of iron rather than in RIA. Moreover, we could identify an iron transporter *cccA* ortholog in the genome, the expression of which was significantly induced in iron-overloaded cells, suggesting that a vacuolar iron homeostasis system exists in *S. apiospermum*.

Altogether, these findings indicate that *S. apiospermum* possesses genetic information needed for iron uptake and regulation. Expression data suggest that, in mycelia, iron acquisition is mediated by both RIA and the siderophore system. Our research group already evidenced the production of extracellular siderophore in *S. apiospermum*, and our genomic analysis found putative orthologous genes for both extra- and intracellular siderophore biosynthesis. Works are in progress to identify all the hydroxamate-type siderophores produced by *S. apiospermum*, with a particular emphasis on intracellular siderophore biosynthesis. Moreover, the role of siderophores during *Scedosporium* infections has not been studied so far, and experiments in a rodent model of scedosporium virulence.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YL, J-PB, PV: Conceived and designed the experiments; YL, PV: Performed the experiments; YL, NP, SL, BL, PV: Analyzed the data; YL, PV: Wrote the paper. All authors read and approved the manuscript.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb. 2018.00827/full#supplementary-material

siderophores ferricrocin and hydroxyferricrocin. *Appl. Environ. Microbiol.* 77, 4959–4966. doi: 10.1128/AEM.00182-11

- Chen, M., Kondori, N., Deng, S., Gerrits van den Ende, A. H. G., Lackner, M., Liao, W., et al. (2017). Direct detection of *Exophiala* and *Scedosporium* species in sputa of patients with cystic fibrosis. *Med. Mycol.* doi: 10.1093/mmy/myx108. [Epub ahead of print].
- Cortez, K. J., Roilides, E., Quiroz-Telles, F., Meletiadis, J., Antachopoulos, C., Knudsen, T., et al. (2008). Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 157–197. doi: 10.1128/CMR. 00039-07
- Donzelli, B. G. G., and Krasnoff, S. B. (2016). "Chapter ten Molecular genetics of secondary chemistry in metarhizium fungi," in Advances in Genetics Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi, eds B. Lovett and R. J. St. Leger (Academic Press), 365–436.
- Douglas, A. P., Chen, S. C., and Slavin, M. A. (2016). Emerging infections caused by non-Aspergillus filamentous fungi. Clin. Microbiol. Infect. 22, 670–680. doi: 10.1016/j.cmi.2016.01.011
- Eisendle, M., Oberegger, H., Zadra, I., and Haas, H. (2003). The siderophore system is essential for viability of Aspergillus nidulans: functional analysis of two genes encoding l-ornithine N 5-monooxygenase (sidA) and a non-ribosomal peptide synthetase (sidC). Mol. Microbiol. 49, 359–375. doi: 10.1046/j.1365-2958.2003.03586.x

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

Iron Metabolism Genes in Scedosporium apiospermum

- Franken, A. C., Lechner, B. E., Werner, E. R., Haas, H., Lokman, B. C., Ram, A. F., et al. (2014). Genome mining and functional genomics for siderophore production in *Aspergillus niger. Brief. Funct. Genomics* 13, 482–492. doi: 10.1093/bfgp/elu026
- Frey, P. A., and Reed, G. H. (2012). The ubiquity of iron. ACS Chem. Biol. 7, 1477–1481. doi: 10.1021/cb300323q
- Galagan, J. E., Calvo, S. E., Cuomo, C., Ma, L.-J., Wortman, J. R., Batzoglou, S., et al. (2005). Sequencing of Aspergillus nidulans and comparative analysis with A. fumigatus and A. oryzae. Nature 438, 1105–1115. doi: 10.1038/nature04341
- Giuliano Garisto Donzelli, B., Gibson, D. M., and Krasnoff, S. B. (2015). Intracellular siderophore but not extracellular siderophore is required for full virulence in *Metarhizium robertsii*. *Fungal Genet. Biol.* 82, 56–68. doi: 10.1016/j.fgb.2015.06.008
- Grant, C. E., Bailey, T. L., and Noble, W. S. (2011). FIMO: scanning for occurrences of a given motif. *Bioinformatics* 27, 1017–1018. doi: 10.1093/bioinformatics/btr064
- Gründlinger, M., Yasmin, S., Lechner, B. E., Geley, S., Schrettl, M., Hynes, M., et al. (2013). Fungal siderophore biosynthesis is partially localized in peroxisomes. *Mol. Microbiol.* 88, 862–875. doi: 10.1111/mmi.12225
- Gsaller, F., Eisendle, M., Lechner, B. E., Schrettl, M., Lindner, H., Müller, D., et al. (2012). The interplay between vacuolar and siderophore-mediated iron storage in Aspergillus fumigatus. Metallomics 4, 1262–1270. doi: 10.1039/c2mt20179h
- Guarro, J., Kantarcioglu, A. S., Horr, & R., Rodriguez-Tudela, J. L., Cuenca Estrella, M., Berenguer, J., et al. (2006). Scedosporium apiospermum: changing clinical spectrum of a therapy-refractory opportunist. Med. Mycol. 44, 295–327. doi: 10.1080/13693780600752507
- Haas, H. (2012). Iron a key nexus in the virulence of Aspergillus fumigatus. Front. Microbiol. 3:28. doi: 10.3389/fmicb.2012.00028
- Haas, H. (2014). Fungal siderophore metabolism with a focus on Aspergillus fumigatus. Nat. Prod. Rep. 31, 1266–1276. doi: 10.1039/C4NP00071D
- Haas, H., Eisendle, M., and Turgeon, B. G. (2008). Siderophores in fungal physiology and virulence. Annu. Rev. Phytopathol. 46, 149–187. doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094338
- Haas, H., Schoeser, M., Lesuisse, E., Ernst, J. F., Parson, W., Abt, B., et al. (2003). Characterization of the Aspergillus nidulans transporters for the siderophores enterobactin and triacetylfusarinine C. Biochem. J. 371, 505–513. doi: 10.1042/bj20021685
- Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. (1984). Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J.* 219, 1–14. doi: 10.1042/bj2190001
- Hortschansky, P., Eisendle, M., Al-Abdallah, Q., Schmidt, A. D., Bergmann, S., Thön, M., et al. (2007). Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex–a novel mechanism of gene regulation by iron. *EMBO J.* 26, 3157–3168. doi: 10.1038/sj.emboj.7601752
- Jung, W. H., Sham, A., Lian, T., Singh, A., Kosman, D. J., and Kronstad, J. W. (2008). Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus* neoformans. PLoS Pathog. 4:e45. doi: 10.1371/journal.ppat.0040045
- Kensche, P. R., Oti, M., Dutilh, B. E., and Huynen, M. A. (2008). Conservation of divergent transcription in fungi. *Trends Genet. TIG* 24, 207–211. doi: 10.1016/j.tig.2008.02.003
- Knight, S. A., Vilaire, G., Lesuisse, E., and Dancis, A. (2005). Iron acquisition from transferrin by *Candida albicans* depends on the reductive pathway. *Infect. Immun.* 73, 5482–5492. doi: 10.1128/IAI.73.9.5482-5492.2005
- Koehler, P., Tacke, D., and Cornely, O. A. (2016). Bone and joint infections by Mucorales, Scedosporium, Fusarium and even rarer fungi. *Crit. Rev. Microbiol.* 42, 158–171. doi: 10.3109/1040841X.2014.910749
- Kosman, D. J. (2013). Iron metabolism in aerobes: managing ferric iron hydrolysis and ferrous iron autoxidation. *Coord. Chem. Rev.* 257, 210–217. doi: 10.1016/j.ccr.2012.06.030
- Kragl, C., Schrettl, M., Abt, B., Sarg, B., Lindner, H. H., and Haas, H. (2007). EstB-mediated hydrolysis of the siderophore triacetylfusarinine C optimizes iron uptake of *Aspergillus fumigatus*. *Eukaryotic Cell* 6, 1278–1285. doi: 10.1128/EC.00066-07
- Lamaris, G. A., Chamilos, G., Lewis, R. E., Safdar, A., Raad, I. I., and Kontoyiannis, D. P. (2006). Scedosporium infection in a tertiary care cancer center: a review of 25 cases from 1989-2006. *Clin. Infect. Dis.* 43, 1580–1584. doi: 10.1086/509579
- Llanos, A., François, J. M., and Parrou, J. L. (2015). Tracking the best reference genes for RT-qPCR data normalization in filamentous fungi. *BMC Genomics* 16:71. doi: 10.1186/s12864-015-1224-y

- López-Berges, M. S., Capilla, J., Turrà, D., Schafferer, L., Matthijs, S., Jöchl, C., et al. (2012). HapX-mediated iron homeostasis is essential for rhizosphere competence and virulence of the soilborne pathogen *Fusarium oxysporum*. *Plant Cell* 24, 3805–3822. doi: 10.1105/tpc.112.098624
- Martinez, D., Berka, R. M., Henrissat, B., Saloheimo, M., Arvas, M., Baker, S. E., et al. (2008). Genome sequencing and analysis of the biomass-degrading fungus *Trichoderma reesei* (syn. *Hypocrea jecorina*). *Nat. Biotechnol.* 26, 553–560. doi: 10.1038/nbt1403
- Nierman, W. C., Pain, A., Anderson, M. J., Wortman, J. R., Kim, H. S., Arroyo, J., et al. (2005). Genomic sequence of the pathogenic and allergenic filamentous fungus Aspergillus fumigatus. Nature 438, 1151–1156. doi: 10.1038/nature04332
- Oberegger, H., Eisendle, M., Schrettl, M., Graessle, S., and Haas, H. (2003). 4'-phosphopantetheinyl transferase-encoding npgA is essential for siderophore biosynthesis in Aspergillus nidulans. Curr. Genet. 44, 211–215. doi: 10.1007/s00294-003-0434-z
- Oberegger, H., Zadra, I., Schoeser, M., Abt, B., Parson, W., and Haas, H. (2002). Identification of members of the Aspergillus nidulans SREA regulon: genes involved in siderophore biosynthesis and utilization. Biochem. Soc. Trans. 30, 781–783. doi: 10.1042/bst0300781
- O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., et al. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic Colletotrichum fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nat. Genet.* 44, 1060–1065. doi: 10.1038/ng.2372
- Pel, H. J., de Winde, J. H., Archer, D. B., Dyer, P. S., Hofmann, G., Schaap, P. J., et al. (2007). Genome sequencing and analysis of the versatile cell factory Aspergillus niger CBS 513.88. Nat. Biotechnol. 25, 221–231. doi: 10.1038/nbt1282
- Philpott, C. C. (2006). Iron uptake in fungi: a system for every source. Biochim. Biophys. Acta 1763, 636–645. doi: 10.1016/j.bbamcr.2006.05.008
- Pihet, M., Carrere, J., Cimon, B., Chabasse, D., Delhaes, L., Symoens, F., et al. (2009). 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
- Ramanan, N., and Wang, Y. (2000). A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. *Science* 288, 1062–1064. doi: 10.1126/science.288.5468.1062
- Reiber, K., Reeves, E. P., Neville, C. M., Winkler, R., Gebhardt, P., Kavanagh, K., et al. (2005). The expression of selected non-ribosomal peptide synthetases in Aspergillus fumigatus is controlled by the availability of free iron. FEMS Microbiol. Lett. 248, 83–91. doi: 10.1016/j.femsle.2005.05.028
- Saikia, S., Oliveira, D., Hu, G., and Kronstad, J. (2014). Role of ferric reductases in iron acquisition and virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. *Infect. Immun.* 82, 839–850. doi: 10.1128/IAI.01357-13
- Schafferer, L., Beckmann, N., Binder, U., Brosch, G., and Haas, H. (2015). AmcAa putative mitochondrial ornithine transporter supporting fungal siderophore biosynthesis. *Front. Microbiol.* 6:252. doi: 10.3389/fmicb.2015.00252
- Schrettl, M., Beckmann, N., Varga, J., Heinekamp, T., Jacobsen, I. D., Jöchl, C., et al. (2010). HapX-mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. *PLoS Pathog*. 6:e1001124. doi: 10.1371/journal.ppat.1001124
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Joechl, C., Rogers, T., Arst, H. N., et al. (2004). Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for Aspergillus fumigatus virulence. J. Exp. Med. 200, 1213–1219. doi: 10.1084/jem.20041242
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., et al. (2007). Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog.* 3, 1195–1207. doi: 10.1371/journal.ppat.0030128
- Schrettl, M., Kim, H. S., Eisendle, M., Kragl, C., Nierman, W. C., Heinekamp, T., et al. (2008). SreA-mediated iron regulation in Aspergillus fumigatus. Mol. Microbiol. 70, 27–43. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06376.x
- Stearman, R., Yuan, D. S., Yamaguchi-Iwai, Y., Klausner, R. D., and Dancis, A. (1996). A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. *Science* 271, 1552–1557. doi: 10.1126/science.271.5255.1552
- Urbanowski, J. L., and Piper, R. C. (1999). The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. J. Biol. Chem. 274, 38061–38070. doi: 10.1074/jbc.274.53.38061
- Vandeputte, P., Ghamrawi, S., Rechenmann, M., Iltis, A., Giraud, S., Fleury, M., et al. (2014). Draft genome sequence of the pathogenic

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

April 2018 | Volume 9 | Article 827

Iron Metabolism Genes in Scedosporium apiospermum

fungus Scedosporium apiospermum. Genome Announc. 2:e00988-14. doi: 10.1128/genomeA.00988-14

- von Döhren, H. (2009). A survey of nonribosomal peptide synthetase (NRPS) genes in Aspergillus nidulans. Fungal Genet. Biol. 46(Suppl. 1), S45–S52. doi: 10.1016/j.fgb.2008.08.008
- Walsh, T. J., and Groll, A. H. (1999). Emerging fungal pathogens: evolving challenges to immunocompromised patients for the twenty-first century. *Transpl. Infect. Dis.* 1, 247–261. doi: 10.1034/j.1399-3062.1999.010404.x
- Wang, T. P., Quintanar, L., Severance, S., Solomon, E. I., and Kosman, D. J. (2003). Targeted suppression of the ferroxidase and iron trafficking activities of the multicopper oxidase Fet3p from *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Inorg. Chem. 8, 611–620. doi: 10.1007/s00775-003-0456-5
- Yasmin, S., Alcazar-Fuoli, L., Gründlinger, M., Puempel, T., Cairns, T., Blatzer, M., et al. (2012). Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, E497–E504. doi: 10.1073/pnas.1106399108
- Yun, C. W., Bauler, M., Moore, R. E., Klebba, P. E., and Philpott, C. C. (2001). The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biol. Chem. 276, 10218–10223. doi: 10.1074/jbc.M010065200

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2018 Le Govic, Papon, Le Gal, Lelièvre, Bouchara and Vandeputte. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Primers	Sequence	Use
520033-E		aPCB
Sa0022 P	\mathbf{F}'	
3d9033-N	S-GAGITTECTAGTETGEGACA-S	YPCN
Sa9032-F	5'- CCAGGTCCTGGATGATTCTTC-3'	qPCR
Sa9032-R	5'- GATGCCAATATCTAGCCCGC-3'	aPCR
		-1 -
Sa2806-F	5'- CAGTTGTGCACCAGGATGTC-3'	qPCR
Sa2806-R	5'- CGACTTCCTTCCAAGACTCG-3'	qPCR
Sa2803-F	5'- CAGGTACCGAGGACCTCATA-3'	qPCR
Sa2803-R	5'- CAAACGCACTCCTCTTGTGA-3'	qPCR
Sa2272-F	5'- GTAGCCAGATCTTCACGACG-3'	qPCR
Sa2272-R	5'- GATAACCATCTCCATGCCGC-3'	qPCR
Sa2805-F	5'- CACCAAGTCTGCAACCTCCA-3'	qPCR
Sa2805-R	5'- GCATGCGGTCACCAATGAAG-3'	qPCR
Sa2796-F	5'- GAGGCAGCGGATATGAAGAC-3'	PCR
Sa2796-R	5'- CTAAGACCGGCGAAGGAATG-3'	PCR
Sa2796bis-F	5'- GACTTGGCTGTCGAGCTTGG -3'	qPCR/PCR
Sa2796bis-R	5'- CTCGAGAATCCCGCCTTCTG -3'	qPCR/PCR
Sa2796-F-start	5'- GGCGCCCCAGGTCATCAAC -3'	PCR
Sa2796-R-stop	5'- CACGACTCCAAGTCCCCTC-3'	PCR
Sa5197-F	5'- CGAGGGACCTTTTCCCTGAAG -3'	qPCR
Sa5197-R	5'- CTAGAGAGAGCTTGGCGTCTC -3'	qPCR
Sa10183-F	5'- ACCAACCGAGACTGTTAGGG-3'	qPCR
Sa10183-R	5'- CGTCCAGATAGCTTCGATG-3'	qPCR
Sa3378-F	5'- GTGCCCTCGAAGCTGTTGAA-3'	qPCR
Sa3378-R	5'- TTGTGAGGCTGCGACTGAAG-3'	qPCR
C-2470 F		*DCD
Sa2478-F		dPCR
Sa2478-R	5'- GUCAATACTGUGAATUUGAU-3'	d PCR
522801-F		aPCR
Sa2004 1	5'- GACTTCTGCTTTCCGAGGTC-2'	aPCP
382004-11		qr civ
Sa1833-F	5'- GTCGAGAGCTACCAGCATGT-3'	aPCR
Sa1833-R	5'- CCACCTTGTGAACCTCAACC-3'	aPCB
001000 11		q. en
Sa4564-F	5'- GAGAACTCTGACGCCCAAAG-3'	aPCR
Sa4564-R	5'- CCGAACGAAGACGTCACGAA-3'	aPCR
		4
Sa4736-F	5'- GCTCATGACCAGAGTATCAGC-3'	qPCR
Sa4736-R	5'- GCTTGCGGAAGTGAATGAGG-3'	gPCR
Sa5249-F	5'- GCGCATCCTTACCATCATTG-3'	qPCR
Sa5249-R	5'- ACGGAATATCACGCCTCTCA-3'	qPCR
Sa6391-F	5'- CAAGACTCTCGTCGGTGTGG-3'	qPCR
Sa6391-R	5'- GATTGGGCCTTGTCTTTGGC-3'	qPCR
1		

Supplementary Table S1: List of primers used in this study.

Sa9285-F	5'- GGCGAGACTTCGGATACTTC-3'	aPCR
		aDCD
29202-K	5 - GATGULAGAUGAGAGAAGUGT-3	ЧРСК
Sa2801-F	5'- GGTCAAATCTACACCGTGGT-3'	qPCR
Sa2801-R	5'- TACCGTTGATAGCAGGTTGG-3'	aPCR
		9. 0.1
S25446 E		aDCP
		4FCN
Sa5446-R	5'- GICAGAAIGGACGGAAAC-3'	qPCR
Sa0314-F	5'- CGCTGCTGCAAATACCCAA -3'	qPCR
Sa0314-R	5'- CCTTCTTCAAATCCAGCGC -3'	aPCR
		9. 0.1
S20215 E		aDCP
300313-F		YFCK
Sa0315-R	5'- GGATAGTGCTGATAGTGGC-3'	qPCR
Sa0321-F	5'- GAAGCAGACTCTAGACCGG -3'	qPCR
Sa0321-R	5'- CGAACCCGTAGAAAATACCG -3'	aPCR
		4
S20222 E		aDCP
3d0322-F	5 - COUTOUTOGAAACACTCATA -S	YFCK
Sa0322-R	5'- CAAIGCCCAIGAIGCAGCIG -3'	qPCR
Sa8659-F	5'- GCGGGAGGAAATGTTGAGG -3'	qPCR
Sa8659-R	5'- GATACGCGAGCGCTTCACAC -3'	aPCR
		4
Sa1476-E		aPCP
		UPCN
Sa1476-R	5 - CGATCACGTAGGCGTAGAAG -3	d L K
Sa2383-F	5'- GCGTCGATGAGGAACAATCT -3'	qPCR
Sa2383-R	5'- CGACTATCGATGCGCGAACT -3'	qPCR
Sa5404-E	5'- CGGTCGTATCGTCATCATCG -3'	aPCR
	\mathbf{F}'	aDCP
3a3404-N	J - CUTAGAAAGCUTUTCUGAC -S	YPCK
C. COF2 F		
Sa6952-F	5 - GLGLLAGAALTAGALATTLT -3	qPCR
Sa6952-R	5'- GCCGATCATGTTAGCGTCAA -3'	qPCR
Sa9014-F	5'- CTCTGGAACAAGTCACTACGC -3'	aPCR
Sa9014-R	5'- GAAGTGTGATGGCAATGGGAG -3'	aPCB
505014 1		qi ch
S-0422 E		aDCB
Sd9433-F	5 - CGCGCGGATACTITACAATC - 3	QPCR
Sa9433-R	5'- CAGGAGGAACIGCGICAIGI-3'	qPCR
Sa10060-F	5'- CCGAAAGGACATTCTCCGTA-3'	qPCR
Sa10060-R	5'- GCAAACAGTGACGCAGAGAG-3'	aPCR
		-1 -
Sa10508-E	5'- CCC6CAAGCCGTTGAATGTT-3'	aPCR
5a10508-1		
Sa10208-K	5 - GATGGGAAGGAGGAGGATGGCAA-3	QPCR
Sa10726-F	5'- CGAATCGTGATGCTTGGCGG-3'	qPCR
Sa10726-R	5'- GGAGCTCTTGAATGTGGTCG-3'	qPCR
SaUbcB-F*	5'- CCGGAGAGTTGTGCCTTGA-3'	aPCR
SallbcB-R*	5'- CAGGTTCGATGCTTCGACG-3'	aPCB
	J CAUTICUATUCITCUACU-J	
		-DCD
SaSarA-F*	5 - CATCAGUIUGUIUTUIACCA-3	qPCK
SaSarA-R*	5'- CGTATTGGGACAACCACCGT-3'	qPCR

*Reference genes used for normalization of gene expression data.

Supplementary Table S2: Occurrence of CCAAT motif in the promoter region of iron-related genes.

motif_alt_id	SAPIO_CDS	start	stop	strand	score	p-value	q-value	matched_sequence
CCAAT	314	943	947	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	314	1213	1217	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	314	1503	1507	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	314	1649	1653	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	315	343	347	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	315	489	493	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	315	779	783	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	315	1049	1053	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	321	825	829	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	321	1225	1229	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	321	1855	1859	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	322	48	52	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	322	133	137	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	322	565	569	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	322	633	637	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	322	1461	1465	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	1476	544	548	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	1476	739	743	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	1476	874	878	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	1476	1290	1294	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	1476	1701	1705	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	1476	1769	1773	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	1833	128	132	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	1833	1128	1132	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	1833	1402	1406	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	1833	1789	1793	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2272	340	344	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2272	608	612	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2272	611	615	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	2383	3	7	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	2383	169	173	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	2383	1649	1653	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	2478	445	449	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2478	1629	1633	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2478	1956	1960	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2796	144	148	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2796	1480	1484	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2796	1977	1981	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2801	263	267	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez Scedosporium apiospermum, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose

CCAAT	2801	432	436	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2801	1114	1118	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	2801	1226	1230	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	2803	899	903	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2804	1247	1251	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2805	1242	1246	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2805	1816	1820	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2805	1868	1872	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2806	1318	1322	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	2806	1759	1763	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	3378	29	33	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	3378	119	123	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	3378	153	157	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	3378	1114	1118	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	4564	789	793	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	4564	835	839	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	4564	1104	1108	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	4564	1161	1165	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	4564	1934	1938	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	4736	405	409	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	4736	416	420	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	4736	1521	1525	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	5197	49	53	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	5197	1223	1227	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	5197	1484	1488	+	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	5197	1993	1997	+	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	5249	389	393	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	5249	762	766	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	5249	1695	1699	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	5249	1987	1991	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	5404	841	845	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	5404	922	926	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	5404	1123	1127	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	5446	290	294	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	5446	452	456	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	5446	1286	1290	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	5446	1459	1463	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	5446	1490	1494	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	6391	915	919	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	6391	1698	1702	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	6952	1749	1753	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez Scedosporium apiospermum, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose

CCAAT	8659	20	24	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	8659	486	490	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	8659	532	536	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	8659	554	558	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	8659	983	987	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	8659	1252	1256	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	9014	24	28	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9014	273	277	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9014	770	774	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	9014	1444	1448	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9014	1797	1801	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9032	662	666	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	9033	30	34	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9033	804	808	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	9033	1022	1026	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9285	169	173	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9285	276	280	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	9285	777	781	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9285	1567	1571	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9285	1781	1785	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	9433	385	389	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9433	394	398	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9433	424	428	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	9433	881	885	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	9433	962	966	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	9433	1157	1161	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	9433	1716	1720	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	10060	64	68	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	10060	1231	1235	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	10183	630	634	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	10183	1309	1313	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	10508	109	113	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	10508	407	411	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	10508	464	468	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	10508	1399	1403	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	10508	1569	1573	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	10726	42	46	+	9.38788	0.00105	0.769	ccaat
CCAAT	10726	585	589	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT
CCAAT	10726	918	922	-	9.38788	0.00105	0.769	CCAAT

2. Etude *in silico* du potentiel de synthèse NRPS chez *S. apiospermum*

Etant donné l'importance des NRPSs chez d'autres champignons impliqués en médecine humaine, nous avons poursuivi l'analyse bioinformatique en élargissant nos investigations à l'ensemble des clusters de gènes comportant une NRPS au sein du génome de *Scedosporium apiospermum* (souche IHEM 14462).

Ce travail a donné lieu à une publication dans la revue *Frontiers in Microbiology* en 2019.

2.1. Résumé

Les champignons microscopiques, tout comme les bactéries, sont capables de coloniser les milieux aquatiques, le sol, et même d'autres êtres vivants. Pour ce faire, ils doivent optimiser les interactions avec leur environnement et développer des stratégies d'attaque et de défense contre les espèces concurrentes car les ressources sont limitées. A titre d'exemples, ils optimisent leur capacité à absorber les nutriments (*e.g.* le fer) et sources d'énergie disponibles ; ils colonisent le milieu par formation de biofilm ; ils neutralisent les microorganismes rivaux par la production d'antimicrobiens et de toxines et se protègent contre les attaques des autres espèces, voire même de l'organisme hôte. De par leur grande diversité de structures chimiques, les peptides non-ribosomiques (NRPs) figurent au premier rang parmi les métabolites produits pour couvrir ces tâches. Leur biosynthèse est assurée par de larges enzymes multimodulaires, les NRPSs (Non Ribosomal Peptide Synthetases). Du fait de l'importance de la voie non-ribosomique, ainsi que des peptides produits par cette voie, des outils bioinformatiques dédiés ont été développés.

Nous avons interrogé le génome de *S. apiospermum* IHEM 14462 en utilisant le logiciel antiSMASH (version fongique) qui, parmi l'ensemble des outils de prédiction disponibles, semblait donner les résultats les plus fiables et les plus détaillés directement à partir d'une séquence génomique. La fonction putative de chaque NRPS a ensuite été déterminée par l'analyse phylogénétique des domaines d'adénylation, tandis que la structure du peptide produit a été appréhendée par différents programmes dont certains sont automatiquement inclus dans le logiciel antiSMASH.

Cette recherche a abouti à l'identification, en plus des 2 clusters impliqués dans la biosynthèse des sidérophores, de 7 autres clusters comprenant un gène de type NRPS. L'analyse des domaines A a permis de prédire le nombre d'acides aminés constitutifs des peptides synthétisés, et, pour 4 d'entre eux, la classe à laquelle appartiendrait le peptide : épidithiodioxopipérazines (ETP ; n = 2) ou cyclopeptides (n = 2). Bien que les 2 gènes ETPs présentent des similitudes avec les NRPSs impliquées dans la production d'un composé de type gliotoxine/sirodesmine, l'analyse phylogénétique réalisée sur un large panel de domaines A, combinée à une exploration approfondie des clusters correspondants, est davantage en faveur de la biosynthèse d'une clapurine (SAPIO_CDS10275) ou d'un dérivé de l'acétylaranotine (SAPIO_CDS1828). En outre, l'analyse fine du cluster portant le locus 1828 a permis de retrouver la quasi-totalité des gènes de la voie de biosynthèse de l'acétylaranotine et de ses dérivés (boydines) décrits chez *S. boydii*, une espèce soeur de *S. apiospermum*. Les deux gènes potentiellement impliqués dans la synthèse de cyclopeptides (SAPIO_CDS6317 et SAPIO_CDS10511), quant à eux, sont phylogénétiquement proches de gènes NRPS impliqués dans la synthèse

de peptides de la classe des enniatines ou destruxines, dont certains dérivés appelés pseudacyclines ont d'ailleurs été isolés de filtrats de culture chez *S. boydii*. Cependant, les différents outils bioinformatiques visant à déterminer les acides aminés pris en charge par les domaines d'adénylation n'ont pas fourni de résultats probants, empêchant ainsi de prédire la nature exacte des peptides synthétisés.

Les résultats de cette étude montrent un potentiel de synthèse NRPS important chez *S. apiospermum*. Ils soulignent également les limites des outils d'analyse des synthétases produites par les champignons, et incitent à la réalisation de manipulations génétiques afin de déterminer la structure chimique des peptides non-ribosomiques produits.

2.2. Article



ORIGINAL RESEARCH published: 04 September 2019 doi: 10.3389/fmicb.2019.02062



Non-ribosomal Peptide Synthetase Gene Clusters in the Human Pathogenic Fungus Scedosporium apiospermum

Yohann Le Govic^{1,2*}, Nicolas Papon¹, Solène Le Gal^{3,4}, Jean-Philippe Bouchara^{1,2} and Patrick Vandeputte^{1,2†}

¹ Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP, EA 3142), SFR ICAT 4208, Université d'Angers, Angers, France, ² Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Université d'Angers, Angers, France, ³ Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP, EA 3142), SFR ICAT 4208, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France, ⁴ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Université de Bretagne Occidentale, Brest, France,

OPEN ACCESS

Edited by:

Tamás Papp, University of Szeged, Hungary

Reviewed by:

Gang Liu, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, China Jason E. Stajich, University of California, Riverside, United States

*Correspondence: Yohann Le Govic yohann.legovic@univ-angers.fr

[†]Present address: Patrick Vandeputte, Vascular Medicine, University Hospital Center, Angers, France

Specialty section:

This article was submitted to Fungi and Their Interactions, a section of the journal Frontiers in Microbiology

Received: 04 June 2019 Accepted: 21 August 2019 Published: 04 September 2019

Citation:

Le Govic Y, Papon N, Le Gal S, Bouchara J-P and Vandeputte P (2019) Non-ribosomal Peptide Synthetase Gene Clusters in the Human Pathogenic Fungus Scedosporium apiospermum. Front. Microbiol. 10:2062. doi: 10.3389/fmicb.2019.02062 Scedosporium species are opportunistic fungi which preferentially affect patients with underlying conditions such as immunosuppression or cystic fibrosis (CF). While being the second most common molds capable to chronically colonize the CF lungs, the natural history of infection remains unclear. In filamentous fungi, a broad range of important secondary metabolites that are recognized as virulence factors are produced by multidomain non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs). The aim of this study was to provide a global in silico analysis of NRPS-encoding genes based on the recently sequenced Scedosporium apiospermum genome. We uncovered a total of nine NRPS genes, of which six exhibited sufficient similarity scores with other fungal NRPSs to predict the class of the generated peptide: siderophores (n = 2), epidithiodioxopiperazines (n = 2), and cyclopeptides (n = 2). Phylogenetic trees based on the multiple alignments of adenylation (A) domain sequences corroborated these findings. Nevertheless, substrate prediction methods for NRPS A-domains tended to fail, thus questioning about the exact nature of the peptide produced. Further studies should be undertaken since NRPSs, which are not synthesized by human cells, could represent attractive therapeutic targets.

Keywords: non-ribosomal peptide synthetases, 4'-phosphopantetheinyl transferase, mycotoxins, siderophores, epidithiodioxopiperazines, genome mining, fungi, Scedosporium

INTRODUCTION

Non-ribosomal peptide synthetases (NRPSs) are multi-modular enzymes which catalyze the synthesis of highly diverse natural products of bacterial or fungal origin, referred to as non-ribosomal peptides (NRPs). These compounds exhibit a broad range of biological functions, including iron acquisition (Schrettl et al., 2007) as well as insecticidal, nematicidal, phytotoxic, antimicrobial, and antiviral activities (Süssmuth et al., 2011). From a medical point of view, fungal NRPs comprise many pharmacologically relevant compounds such as the β -lactam antibiotics (penicillins and cephalosporins) (Felnagle et al., 2008), the echinocandin antifungals

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

(Yue et al., 2015), or the immunosuppressant cyclosporine A (Felnagle et al., 2008). In contrast to ribosomally synthesized peptides, which are diversified by post-translational modification events, complexity-generating structural transformations of the NRP backbone occur at several additional levels within the biosynthetic pathway. First, the NRPSs can incorporate far more monomers than the ribosomal machinery, including modified versions of the proteinogenic amino acids (e.g., methylated or hydroxylated amino acids, and D-forms) but also non-proteinogenic amino acids (e.g., isovaline) as well as unusual carboxylic and hydroxy acids (Finking and Marahiel, 2004). Second, NRPs are further diversified during chain releasing from the assembly line which often aims to rigidify the peptide scaffold through cyclization.

Non-ribosomal peptide synthetases contain multiple active sites (domains) and are characterized by bearing intermediates covalently tethered by a series of phosphopantetheine (PPant)linked thioester bonds at the thiolation (T) domains during biosynthesis. The key components of these molecular assembly lines are the adenylation (A) domains, which select and activate specific building blocks in an ATP-dependent manner before being loaded onto the PPant arm. At this stage, the T domain-tethered substrates may be modified by neighboring epimerization (E) or methylation (M) domains which are optional domains (Walsh et al., 2001). The condensation (C) domains then catalyze the formation of peptide- or ester-bond between two adjacent Ppant-linked substrates. This sequence of reactions is repeated until the full-length polypeptide is generated. In most cases, the peptide chain is released from the NRPS complex by an intra- or intermolecular cyclization event catalyzed by a single C-terminal thioesterase domain. Finally, the peptide scaffold can undergo various modifications after extension, such as oxidation (Chen and Walsh, 2001), halogenation (Vaillancourt et al., 2005), heterocyclization, and glycosylation (Wilkinson and Micklefield, 2009), further expanding the diversity of chemical structures.

Scedosporium species (family Microascaceae, phylum Ascomycota) are emerging fungal pathogens that cause a wide range of infections in both immunocompetent and immunocompromised individuals. To date, a total of 10 species are recognized in this genus (Ramirez-Garcia et al., 2018), but the major species encountered in clinical practice remain S. apiospermum and S. boydii in Europe, and S. aurantiacum in Australia. With a prevalence rate varying from 3.1 to 11.9% (Cimon et al., 2000; Horré et al., 2009; Blyth et al., 2010; Masoud-Landgraf et al., 2014; Sedlacek et al., 2015; Ziesing et al., 2016; Schwarz et al., 2017; Coron et al., 2018), Scedosporium species rank second, after Aspergillus fumigatus, among the filamentous fungi that are capable to colonize the airways of patients with cystic fibrosis (CF). Moreover, it has been suggested that Scedosporium species are more virulent than Aspergillus species in a CF clinical context, since Aspergillus species are more frequently detected in sputa but comparatively cause less infections (Schwarz et al., 2018). Nonetheless, there are still few data about the virulence genes permitting in vivo growth and persistence of Scedosporium species. In addition, the treatment of S. apiospermum infections remains challenging due to the low primary susceptibility of the fungus to current antifungal drugs (Cortez et al., 2008). To improve our knowledge on fungal pathogenicity and antifungal resistance mechanisms, the complete genome of a clinical isolate of *S. apiospermum* was sequenced in 2014 (Vandeputte et al., 2014). Here, we present the first genomic study aiming to identify the genes involved in NRP synthesis in *S. apiospermum*.

MATERIALS AND METHODS

Genome Sequence

NCBI accession numbers for the genome sequence of *S. apiospermum* strain IHEM 14462 were used throughout this study (Vandeputte et al., 2014).

Detection and Genomic Organization of Putative NRPS Gene Clusters in S. apiospermum Genome

The detection of the NRPS gene clusters was first performed by using antiSMASH version 4.0.2 (Medema et al., 2011). Since the automated *in silico* analysis of *S. apiospermum* genome misannotated intronless genes as "pseudogenes" (which are not recognized by the antiSMASH software), the identification of additional genes putatively involved in NRPSs biosynthesis was performed through a tBLASTn analysis by using *A. fumigatus* Af293 NRPS-related proteins as query. Besides, the composition and extremities of the clusters containing intronless NRPSencoding genes were further determined through antiSMASH analysis of 100 kb upstream and downstream regions of these genes. A more detailed prediction of the composition of all NRPS clusters (including intronless genes) was finally performed using BLASTx in order to identify the closest orthologs in the database.

Modular Organization of NRPSs

Non-ribosomal peptide synthetases are organized as iterative modules that were detected with antiSMASH. For NRPSs encoded by intronless genes, the nucleotide sequence was first translated into the amino acid sequence using ExPASy¹, and the modular organization was further determined by Pfam².

Adenylation Domain Sequences and Predicted Substrates

Amino acids sequences for NRPSs proteins were taken from the National Center for Biotechnology Information database³, using the locus tag «/region_name = "AA-adenyl-dom" ». For intronless gene, these sequences were retrieved by Pfam analysis of the corresponding proteins.

The primary structure of the *S. apiospermum* NRPS products was deduced from the consensus specificity of each adenylation domain predicted by the following webbased tools: LSI predictor (Baranašić et al., 2014), SeqL-NRPS

¹https://web.expasy.org/translate/ ²https://pfam.xfam.org/ ³http://www.ncbi.nlm.nih.gov

(Knudsen et al., 2016), NRPSPredictor3 SVM, SANDPUMA ensemble, pHMM or the Stachelhaus code, the last four being implemented in antiSMASH.

Phylogenetic Analysis

A phylogenetic study was performed on amino acid sequences of the adenylation domains within putative NRPS genes of *S. apiospermum* compared with a set of fungal A-domains selected from the publication of Bushley et al. (doi: 10.1186/1471-2148-8-328). The amino acid sequences were aligned with MUSCLE (Edgar, 2004), configured for highest accuracy. Maximum likelihood phylogenetic analyses were then performed by PhyML 3.0 (Guindon et al., 2010) with the LG substitution model and 1,000 bootstrap replications. Graphical representation and edition of the phylogenetic trees were made with iTOL v3 (Letunic and Bork, 2016).

RESULTS AND DISCUSSION

Overview of NRPS Gene Clusters in S. apiospermum

In most cases, genes encoding NRPSs in fungi are part of clusters that also include additional genes coding for enzymes/proteins involved in the biosynthesis/transport of these natural products (Cramer et al., 2006; Bushley et al., 2013). To identify such clusters in S. apiospermum, we first searched for genomic regions that contain open reading frames predicted to encode NRPS using the Antismash software. This analysis allowed to identify a total of six putative NRPSs (SAPIO_CDS1828, 6317, 9032, 9221, 9291, and 10511), nine polyketide synthetases (PKS), five hybrids NRPS-PKS, and seven other secondary metabolite (including terpene and indole compounds) biosynthetic gene clusters, in the genome of S. apiospermum strain IHEM 14462. In addition, three other NRPS genes (SAPIO_CDS2806, 8684 and 10275) were detected by a tBLASTn analysis using A. fumigatus NRPS protein sequences as query (Table 1), i.e., a total of nine NRPS clusters (Figure 1). Each of these nine clusters contains only one NRPS gene as core member, but the CDS1828 cluster also comprises a PKS gene (SAPIO_CDS1819) whose ortholog in Aspergillus terreus encodes a protein involved in lovastatin synthesis. Furthermore, a phylogenetic analysis based on adenylation domains revealed that S. apiospermum NRPS are divided into several NRPS clades which globally superimpose with the biological function, i.e., epidithiodioxopiperazine synthetases, siderophore synthetases, cyclopeptide synthetases, and other unassigned synthetases (Figure 2).

Subfamily Analysis

Epidithiodioxopiperazines: CDS1828 and CDS10275

Epidithiodioxopiperazines (ETPs) are a group of highly reactive fungal secondary metabolites characterized by the presence of a diketopiperazine ring. Their toxicity is attributed to the unusual intramolecular disulfide bridge which can crosslink proteins via cysteine bonds, and by generating reactive oxygen species through redox cycling (Fox and Howlett, 2008). Non-ribosomal Peptide Synthesis in Scedosporium apiospermum

In silico analysis allowed us to find two genes (SAPIO_CDS1828 and SAPIO_CDS10275) (Figure 1) putatively involved in the biosynthesis of ETPs compounds in S. apiospermum. As mentioned above, the first one (CDS1828) was identified through antiSMASH analysis and belongs to a ~75-kb-long cluster containing 23 genes, of which 10 are homologs of genes implicated in the synthesis of gliotoxin in A. fumigatus, including notably the Zn(II)₂Cys₆ transcription factor GliZ (CDS1824), the dipeptidase GliJ (CDS1827), the thioredoxin reductase GliT (CDS1830), and the glutathione-S-transferase GliG (CDS1832) (Figure 3). Gliotoxin is an ETP-class toxin derived from the condensation of serine and phenylalanine that is orchestrated by the multi-modular (A1-T1-C1-A2-T2-C2-T3) NRPS GliP (Fox and Howlett, 2008). Although the highest alignment score for S. apiospermum CDS1828 against A. fumigatus genome corresponded to GliP (30% overall identity), domain analysis revealed that the putative protein encoded by SAPIO_CDS1828 contains only one adenylation domain, in addition to one thiolation domain and two condensation domains (C1-A1-T₁-C₂), suggesting that the NRPS is most likely to produce a homodipeptide than a heterodipeptide such as gliotoxin. A relatively similar architecture (T₁-C₁-A₁-T₂-C₂) was observed in the NRPS AtaP, which catalyzes the first step of the ETP acetylaranotin biosynthesis in A. terreus, i.e., the condensation of two molecules of L-phenylalanine (Guo et al., 2013). Interestingly, phylogenetic analysis revealed that A-domains of AtaP and CDS1828 protein were the nearest neighbors among ETP-producing NRPSs (Figure 2). Moreover, prediction of A-domain specificity according to Stachelhaus indicates that CDS1828 could also accept phenylalanine as specific substrate. The production of several acetylaranotin derivatives, namely boydin A, bisdethiobis(methylthio)-deacetylapoaranotin and bisdethiobis(methylthio)-deacetylaranotin, has already been described in S. boydii (Wu et al., 2014; Lan et al., 2016), a species closely related to S. apiospermum. Likewise, the synthesis of boydins B, C, and D, which derives from boydin A by the addition of a polyoxygenated side chain (Wu et al., 2014), requires a polyketide synthetase which is present only in the ETP1828 cluster. Finally, several synthesis intermediates have been identified including phomazine B, cyclo-(2,2'-dimethylthio-Phe-Phe), pseudoboydone C, and cyclo-(Phe-Phe). In light of these data, one may therefore speculate that the NRPS encoded by CDS1828 drives the synthesis of some aranotin-related metabolites (Figure 4).

A tBLASTn search using A. fumigatus Af293 NRPSs as query revealed the presence of a second putative ETP-producing NRPS in S. apiospermum, SAPIO_CDS10275. BLASTx analysis of the genes upstream and downstream this ORF uncovered a ~46-kblong cluster made up of 16 genes, seven of which exhibiting high similarity to the gliotoxin cluster genes of A. fumigatus (Gardiner and Howlett, 2005) and to the sirodesmin cluster genes of Leptosphaeria maculans (Gardiner et al., 2004). Highly conserved genes between these three clusters encode a dipeptidase, a major facilitator superfamily transporter, a glutathione-S-transferase, a cytochrome P450 monooxygenase, an aminotransferase, a thioredoxin reductase, and an NRPS. An ortholog of the prenyltransferase-encoding gene SAPIO_CDS10273 was only

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

Non-ribosomal Peptide Synthesis in Scedosporium apiospermum

TABLE 1 | Results of tBLASTn analysis of the genes involved in non-ribosomal peptide synthesis in A. fumigatus Af293 (taxid:330879) against S. apiospermum (taxid:563466).

Gene	Alias	Peptide produced	A. fumigatus coding sequence	S. apiospermum ortholog (E-value/max identity compared with A. fumigatus protein)	Query cover	S. apiospermum encoded protein (Genbank accession number)
nrps1	pes1 (pesB)	Fumigaclavin C	AFUA_1G10380	SAPIO_CDS6317 (0.0/31%) SAPIO_CDS9291 (0.0/35%) SAPIO_CDS10511 (0.0/34%) SAPIO_CDS8684 (0.0/29%)	93% 97% 89% 93%	KEZ42085.1 KEZ40230.1 KEZ39119.1 NW_015971822.1*
nrps2	sidC	Ferricrocine	AFUA_1G17200	SAPIO_CDS9032 (0.0/26%)	94%	KEZ40035.1
nrps3	sidE	Fumarylalanine	AFUA_3G03350	SAPIO_CDS9221 (0.0/27%) SAPIO_CDS10511 (7e-172/26%) SAPIO_CDS6317 (3e-164/26%)	98% 96% 97%	KEZ40171.1 KEZ39119.1 KEZ42085.1
nrps4	sidD	Fusarinine C	AFUA_3G03420	SAPIO_CDS2806 (0.0/44%) SAPIO_CDS10511 (0.0/37%) SAPIO_CDS6317 (0.0/37%) SAPIO_CDS9291 (4e-146/32%)	88% 89% 89% 91%	NW_015971788.1* KEZ39119.1 KEZ42085.1 KEZ40230.1
nrps5	hasD (pesF)	Hexadehydro astechrome	AFUA_3G12920	SAPIO_CDS10275 (0.0/33%) SAPIO_CDS1828 (5e-141/28%)	93% 85%	NW_015971866.1* KEZ45505.1
nrps6	pesG	Uncharacterized	AFUA_3G13730	SAPIO_CDS10511 (1e-133/32%) SAPIO_CDS6317 (7e-118/29%) SAPIO_CDS9291 (2e-93/28%)	86% 92% 98%	KEZ39119.1 KEZ42085.1 KEZ40230.1
nrps7	pesH	Uncharacterized	AFUA_3G15270	SAPIO_CDS10511 (5e-162/25%) SAPIO_CDS9221 (4e-150/26%) SAPIO_CDS6317 (8e-145/25%)	92% 97% 92%	KEZ39119.1 KEZ40171.1 KEZ42085.1
nrps8	pes3 (pesl)	Uncharacterized	AFUA_5G12730	SAPIO_CDS6317 (0.0/30%) SAPIO_CDS10511 (0.0/30%) SAPIO_CDS9221 (0.0/31%) SAPIO_CDS8684 (0.0/27%)	97% 90% 99% 97%	KEZ42085.1 KEZ39119.1 KEZ40171.1 NW_015971822.1*
nrps9	pesJ	Uncharacterized	AFUA_6G09610	SAPIO_CDS6317 (2e-152/31%) SAPIO_CDS9221 (3e-136/29%) SAPIO_CDS8684 (7e-57/29%)	96% 96% 86%	KEZ42085.1 KEZ40171.1 NW_015971822.1*
nrps10	glip (pesK)	Gliotoxin	AFUA_6G09660	SAPIO_CDS10275 (0.0/29%) SAPIO_CDS1828 (1e-163/30%)	97% 87%	NW_015971866.1* KEZ45505.1
nrps11	pesL (fmqC)	Fumigaclavin C/ Fumiquinazoline	AFUA_6G12050	SAPIO_CDS6317 (6e-118/31%) SAPIO_CDS10511 (1e-108/30%) SAPIO_CDS9291 (3e-97/31%) SAPIO_CDS2806 (2e-95/30%)	90% 90% 88% 88%	KEZ42085.1 KEZ39119.1 KEZ40230.1 NW_015971788.1*
nrps12	pesM (fmqA)	Fumiquinazoline	AFUA_6G12080	SAPIO_CDS8684 (0.0/28%) SAPIO_CDS9291 (0.0/33%) SAPIO_CDS6317 (5e-166/30%)	100% 94% 99%	NW_015971822.1* KEZ42085.1 KEZ42085.1
nrps13	pesN (ftmA)	Brevianamide	AFUA_8G00170	SAPIO_CDS10511 (0.0/33%) SAPIO_CDS6317 (0.0/30%) SAPIO_CDS9221 (0.0/27%)	97% 98% 94%	KEZ39119.1 KEZ42085.1 KEZ40171.1

*Accession number of the contig since the corresponding CDS are considered as pseudogenes in the draft genome sequence of S. apiospermum. Only sequences with a score higher than thresholds (E-value: 1e-50, max identity: 25%, query cover: 85%) are presented.

found in the sirodesmin biosynthetic cluster. Conversely, two genes present in both sirodesmin and gliotoxin clusters, i.e., the zinc finger transcription factor sirZ/gliZ and the methyltransferase sirM/gliM, could not be retrieved in this *S. apiospermum* ETP cluster. The lack of a sirZ or gliZ ortholog is surprising because these genes are known as key regulators of sirodesmin and gliotoxin production, respectively. Indeed, silencing of *L. maculans sirZ* expression using RNAi technology strongly decreased the production of sirodesmin and the expression of the biosynthetic genes (Fox and Howlett, 2008). Likewise, the disruption of gliZ in *A. fumigatus* led to undetectable gliotoxin production and loss of expression of the biosynthetic gene gliI (Bok et al., 2006). Therefore, a

tBLASTn analysis of *S. apiospermum* was carried out using SirZ (accession number: AAS92551.1) as query. Interestingly, the best hit (coverage 14%, identity 47%) unveiled a possible ortholog located in the intergenic region between CDS10268 and CDS10269, which belongs to the *S. apiospermum* ETP₁₀₂₇₅ cluster. Consistently, a BLASTx analysis using the full length sequence of this intergenic region as query (sequence ID: JOWA01000165.1, coordinates: 346573–349838) revealed that it is quite similar to several Zn(II)₂Cys₆ transcription factors of phylogenetically related molds, such as *Metarhizium* or *Trichoderma* species. Likewise, genes of the sirodesmin or the gliotoxin clusters thought to be involved in modifications of the side chains of the core ETP moiety, e.g., the acetyltransferase

Non-ribosomal Peptide Synthesis in Scedosporium apiospermum



sirH or the cytochrome P450 monooxygenases sirB, sirE and gliF, do not have obvious homologs in the *S. apiospermum* ETP₁₀₂₇₅ cluster. As this cluster shares more similarities with the sirodesmin cluster than that of gliotoxin, we studied the structure

of the corresponding NRPS in order to argue about its capacity to synthesize a sirodesmin analog. Conserved domain analysis found two adenylation, two thiolation and two condensation $(A_1-T_1-C_1-A_2-T_2-C_2)$ domains in the amino acid sequence of

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

Non-ribosomal Peptide Synthesis in Scedosporium apiospermum



SAPIO_CDS10275 (**Figure 1**). However, the size of the first A-domain was about half smaller than expected for this type of domain. Subsequently, we performed a search for A-domain signatures in the intergenic region flanking the CDS10274 and 10275, which allowed us to determine the position of a new start codon and thus to define the full sequence of the first A-domain. Unfortunately, both pHMM and Stachelhaus systems failed to predict substrate specificity of the A₁ domain. By contrast, according to the pHMM code, the second A-domain could be able to activate L-tyrosine. Sirodesmin PL is formed by condensation of L-Tyr and L-Ser (Fox and Howlett, 2008). Furthermore, the tyrosyl moiety needs to be prenylated in order to produce the intermediate cyclic dipeptide phomamide. As mentioned above, this step is predicted to be catalyzed by SirD, whose orthologous gene is present in the *S. apiospermum* ETP₁₀₂₇₅ cluster. Moreover, phylogenetic analysis revealed that the A₁ and A₂ domains of SirP and SAPIO_CDS10275 are closely related. Nevertheless, the use of an extended A-domain dataset revealed that the phylogenetically closest ETP gene for SAPIO_CDS10275 was the *Claviceps purpurea tcpP* gene (CPUR_02680), which encodes a bimodular NRPS responsible for the biosynthesis of thioclapurine, an ETP composed of glycine

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

Non-ribosomal Peptide Synthesis in Scedosporium apiospermum



sir/M, sir/N, ata/M, tcp/N), an oxidoreductase (sir/O), a benzoate p-hydroxylase (ata/), and a hypothetical protein (ataL). Abbreviations: SAM MTase, S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase; Tri7 acet/Tase, trichothecene 4-O-acet/Itransferase.

and prenylated tyrosine (Dopstadt et al., 2016). Structurally, the *C. purpurea tcpP* cluster harbors all the genes present in the *S. apiospermum* ETP₁₀₂₇₅ cluster, including an ortholog of *sirD*, plus a γ -glutamyl transferase that is absent in the sirodesmin cluster. Taken together, these data suggest that SAPIO_CDS10275 is responsible for the biosynthesis of a clapurine analog in *S. apiospermum*.

Siderophore Biosynthesis: CDS2806 and CDS9032

In a previous study, we demonstrated that the genome of *S. apiospermum* IHEM14462 contains all the information needed for iron homeostasis, notably two genes encoding for NRPSs putatively involved in the biosynthesis of intracellular (CDS9032) and extracellular (CDS2806) siderophores (Le Govic et al., 2018) (Figure 1), termed "SID." The ~56-kb-long gene cluster bordering SAPIO_CDS9032, an ortholog of *A. fumigatus sidC*, is conserved with enzymes required for siderophore biosynthesis. Aside from the core NRPS related to SidC, an L-ornithine N^5 -monooxygenase gene, usually located in the vicinity of NRPS gene, is present and required for the biosynthesis of both intracellular and extracellular siderophores. This oxygenase has been found just downstream of the SAPIO_CDS9032, and its expression was previously shown to vary according to iron availability (Le Govic et al., 2018). Likewise, the

~54 kb cluster harboring SAPIO_CDS2806, an ortholog of the *A. fumigatus sidD*, contains two other genes putatively involved in siderophore biosynthesis, which are orthologs to *A. fumigatus sidI* and *sidF*. All these genes were upregulated during iron starvation, and conversely downregulated during iron sufficiency (Le Govic et al., 2018).

To further investigate the characteristics of the proteins encoded by SAPIO_CDS9032 and SAPIO_CDS2806, we compared their general structure and phylogenetic position with a number of SidC and SidD orthologs found broadly in the fungal kingdom. The 15-kb SAPIO_CDS9032 gene is predicted to encode a polypeptide of 4921 amino acids (~541 kDa) containing three adenylation, six thiolation, and six condensation domains. As described in other fungal NRPSs synthesizing ferrichrometype siderophores (Schwecke et al., 2006; Bushley et al., 2008), the organization of the S. apiospermum SidC ortholog stands out from the classical $(A-T-C)_n$ architecture, since it consists in three complete A-T-C modules followed by a T-C repeat, and an internal T-C after the second module (A1-T1-C1-A2-T2-C2-T3-C₃-A₃-T₄-C₄-T₅-C₅-T₆-C₆), suggesting an iterative use of the same module to incorporate the same substrate several times. Indeed, ferrichromes are hexapeptides synthesized from NRPSs which contain only three or four adenylation domains that can activate only one kind of substrate. The chemical structure

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

September 2019 | Volume 10 | Article 2062



of ferrichromes is also conserved, with a core iron-binding consisting of three N^5 -acyl- N^5 -hydroxyornithine coupled to triamino acid building blocks, which are usually made from glycine, alanine and/or serine (Haas, 2014). Consistently, all three A-domains of SAPIO_CDS9032 fell into the same cladistic group (intracellular siderophores, termed "iSID"), which was supported by a 83% bootstrap value (Figure 2). Phylogeny of this group using a robust A-domain dataset revealed that A1, A2, and A3 domains from iSID synthetases define six clusters which comprise homologs of either Fusarium graminearum NPS2 (NPS2 lineage) or A. fumigatus SidC (NPS1/SidC lineage) (Figure 5). N-terminal A-domains of both lineages group together while the C-terminal A-domains are more phylogenetically distant. Of note, all three adenylation domains of SAPIO_CDS9032 belonged to the NPS2 lineage, with type-IV ferrichrome synthetases as closest neighbors. Nevertheless, NRPSs with similar architectures can synthesize distinct compounds. For example, type-II ferrichrome-synthetases [structure (A-T-C)₃(T-C)₂], which all belong to the NPS1/SidC lineage, allow the synthesis of ferricrocin in A. fumigatus and Aspergillus nidulans (Haas, 2014), of ferrirhodin in Fusarium sacchari (Munawar et al., 2013), of malonichrome in F. graminearum (Oide et al., 2014), and of ferrichrome A in Omphalotus olearius (Welzel et al., 2005). Conversely, ferrichrome is synthesized by SidC of A. niger (Franken et al., 2014) and Sib1 of Schizosaccharomyces pombe (Schrettl et al., 2004), which do not belong to a common lineage [structure (A(T-C)₂(A-T-C)₂(T-C)₂)]. Considering the variability in the architecture and iterativity of fungal NRPSs orchestrating ferrichromes' synthesis, it is risky to predict the

exact nature of the peptide produced by such proteins. Detailed analytical chemistry is thus required to identify accurately the product of NRPS encoded by SAPIO_CDS9032.

For its part, the 5.8-kb SAPIO_CDS2806 gene is predicted to encode a 1954 AA (215 kDa) NRPS consisting of only one module followed by a T-C didomain (A1-T1-C1-T2-C₂) (Figure 1). This domain architecture resembles that of coprogen- or fusarinine-type NRPSs rather than this exhibited by ferrichrome-type NRPSs, which in ascomycetes are mostly ATC-TC or ATC-TTC (Oide et al., 2006). Consistently, phylogenetic analysis of A-domains showed that the protein encoded by SAPIO_CDS2806 belongs to the NPS6/SidD family, which gathers NRPSs driving the biosynthesis of extracellular siderophores (termed "eSID"), including coprogen and fusarinine NRPSs, with a bootstrap support of 100% (Figure 2). Such proteins are among the most conserved fungal NRPSs, in contrast with other NRPS-encoding genes that are also involved in virulence. Indeed, fusarinines and coprogens are highly similar since their general structure is derived from the same substrate, i.e., N⁵-anhydromevalonyl-N⁵-hydroxy-L-ornithine. None of the NRPS prediction tools was able to predict this group as substrate for Sa SidD; however, chemical analyses demonstrated that S. apiospermum was able to produce and excrete the coprogen-type siderophore N^{α} -methylcoprogen B (Bertrand et al., 2009).

Cyclopeptides: CDS6317 and CDS10511

Genome mining also allowed to identify two NRPS genes, namely SAPIO_CDS6317 and SAPIO_CDS10511, putatively responsible

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

September 2019 | Volume 10 | Article 2062

Non-ribosomal Peptide Synthesis in Scedosporium apiospermum



are reported below branches. All S. apiospermum NRPS A-domains are shown in bold blue.

for the biosynthesis of cyclopeptides. These ORFs are expected to belong to a ~60-kb and a ~56-kb long cluster comprising a total of 14 and 12 genes, respectively (Figure 1). The 21.3-kb-long SAPIO_CDS6317 encodes a predicted NRPS of 6,855 amino acids (756 kDa) containing six modules, one of which is flanked with an epimerization domain (A1-T1-C1-A2-T2-C2-A3-T3-E3-C3-A4-T4-C4-A5-T5-C5-A6-T6-C6), suggesting that the third substrate incorporated during biosynthesis is in D-form, while the 13.3-kb-long SAPIO_CDS10511 encodes a putative NRPS of 4,438 amino acids (490 kDa) organized in four modules with no editing domain (A1-T1-C1-A2-T2-C2-A₃-T₃-C₃-A₄-T₄-C₄) (Figure 1). Both proteins exhibited best BLASTp matches with either enniatin (Esyn1) or destruxin (DtxS1) synthetases, which are mycotoxin-producing NRPSs with a bimodular and hexamodular structure, respectively. Consistently, phylogenetic analysis of A-domains revealed that these proteins group with NRPSs synthesizing cyclopeptides, with nearest neighbors being destruxin, and to a lesser extent, enniatin (Esyn1) and beauvericin (BEAS) synthetases (Figure 2). More precisely, phylogenetic analysis assigned the first four A-domains of the protein coded by SAPIO_CDS6317 to

a clade also harboring the first four A-domains of DtxS1 from Metarhizium species, as well as the first three domains of SAPIO_CDS10511, while the A5 and A6 domains of SAPIO_CDS6317 and the A4 domain of SAPIO_CDS10511 form another clade harboring the last A-domain(s) of NRPS producing cyclohexapeptides. These C-terminal NRPS A-domains are involved in the activation of amino acids that are further alkylated by specific N-methyltransferase domains integrated in the NRPS body (Xu et al., 2008; Giuliano Garisto Donzelli et al., 2012) (Figure 6). By contrast, N-methyltransferase domains could not be retrieved in proteins encoded by SAPIO_CDS6317 and SAPIO_CDS10511. Whether or not these two NRPSs can incorporate amino acids previously methylated through other pathways is unknown. Nevertheless, the fact that all A-domains of the cyclosporine synthetase (SimA), including five with no N-methyltransferase in their vicinity, also fall into the same clade renders this hypothesis unlikely (Figure 7). This feature rather supports the hypothesis of duplication of NRPS modules followed by divergence of the A-domain substrate specificities, making NRPS-specific substrate prediction even more difficult. Related NRPSs that share homologous A-domains with SimA,

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

Non-ribosomal Peptide Synthesis in Scedosporium apiospermum



including DtxS1, Esyn1, BbBEAS, and the synthetases encoded by SAPIO_CDS6317 and SAPIO_CDS10511, probably evolved through a similar process of module duplication, but also fusion of distantly related NRPS modules. Moreover, by using a tBLASTn search against S. apiospermum genome, we did not find any ortholog of the aspartate decarboxylase DtxS4 or the aldo-keto reductase DtxS3, which provide the two first substrates for the dtx assembly line, i.e., β -alanine and α -hydroxyisocaproic acid, respectively (Wang et al., 2012). Altogether, these data allow us to conclude that the putative NRPS coded by SAPIO_CDS10511 and SAPIO_CDS6317 are responsible for the biosynthesis of an uncharacterized cyclotetrapeptide and a destruxin-like cyclohexapeptide, respectively. Interestingly, cyclohexapeptides called pseudacyclins A to E and containing three isoleucine residues (acetylated for one of them) and one residue each of phenylalanine, ornithine, and proline, were identified from the culture filtrate of two reference strains of S. boydii (Pavlaskova et al., 2010).

Unassigned NRPSs: CDS8684, 9221 and 9291

Bioinformatic search found three other NRPS-encoding genes in *S. apiospermum* whose A-domains cluster with a large group of other unassigned NRPSs, with a great variety in terms of domain architecture and function. Of them, two were detected with antiSMASH (SAPIO_CDS9221 and 9291), while the SAPIO_CDS8684 (annotated as "pseudogene") was unveiled through tBLASTn analysis using *A. fumigatus* NRPSs protein sequences as query.

The 16,7-kb-long gene SAPIO_CDS9221 encodes a pentamodular NRPS of 5543 AA (610 kDa), with the last module containing an additional T domain (A1-T1-C1-A2-T2-C2-A3- T_3 - C_3 - A_4 - T_4 - C_4 - A_5 - T_5 - C_5 - T_6) (Figure 1). This gene belongs to a large (76-kb) cluster encompassing 19 genes, some of which encode Major Facilitator (MF) transporters (SAPIO_CDS9217, 9218, and 9228), a mitochondrial ornithine aminotransferase (SAPIO_CDS9229), a cytochrome P450 (SAPIO_CDS9220) and a fungal specific transcription factor (SAPIO_CDS9224). The best BLASTx score with SAPIO_CDS9221 against fungi (taxid:4751) was obtained for an uncharacterized NRPS protein from Nectria haematococca (syn. Fusarium solani) annotated NhNPS9 (NECHADRAFT_82887), which exhibited strictly identical domain architecture and an overall identity of 59%. Phylogenetic analysis of A-domains resulted in a tree where A-domains from the hypothetical protein coded by SAPIO_CDS9221 grouped together with the corresponding A-domains from NhNPS9 (Figure 1). Moreover, a BLASTx analysis of the gene located directly upstream of SAPIO_CDS9221 revealed that it encodes a putative cytochrome P450, with NECHADRAFT_82886 as one of the closest homologs (identity 70%), suggesting that an oxidation step is required during biosynthesis of both peptides.

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

Non-ribosomal Peptide Synthesis in Scedosporium apiospermum



last A-domain(s) of NRPS producing cyclohexapeptides, as well as the eleven A-domains of the cyclosporine synthase (SimA). Black stars symbolize A-domains that incorporate N-methylated amino acids into the peptide chain. Bootstrap support values greater than 50% are reported below branches. All *S. apiospermum* NRPS A-domains are shown in bold blue.

Nevertheless, the current sequence similarity-based methods were unable to produce reliable predictions.

Around 260-kb away from SAPIO_CDS9221, the antiSMASH software detected another ORF putatively involved in the biosynthesis of a NRP (SAPIO_CDS9291) (Figure 1). This gene, 17-kb in length, is predicted to encode a 5500 AA (~609 kDa) NRPS belonging to a ~50-kb cluster composed of 12 genes, including notably a MF transporter (SAPIO_CDS9285), an ATP-Binding Cassette transporter (SAPIO_CDS9286), a cytochrome P450 (SAPIO_CDS9288) and a bZIP_YAP

transcription factor (SAPIO_CDS9290). BLASTx analyses with the gene SAPIO_CDS9291 against fungal sequences ranked the *Parastagonospora nodorum* SNOG_14098 as best hit (identity 55%; query cover 99%). Besides being tetramodular, these two NRPSs displayed a strictly similar domain architecture, including an additional epimerization domain within the first and last modules (A₁-T₁-E₁-C₁-A₂-T₂-C₂-A₃-T₃-C₃-A₄-T₄-E₄-C₄), which suggests that the corresponding substrates incorporated during biosynthesis are in D-form. Moreover, phylogenetic analysis revealed that each A-domain group with

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

its corresponding homolog within the "other NRPSs" clade (Figure 2), while the organization of both clusters is globally similar (not shown). Unfortunately, the prediction model of Stachelhaus et al. failed to predict the amino acid substrates of adenylation domains of these NRPSs, while the other prediction models gave disparate results. In all, one may thus speculate that SAPIO_CDS9291 encodes an NRPS that is responsible for the biosynthesis of a peptide similar to its *P. nodorum* ortholog without presuming their exact structure.

As evoked above, the last S. apiospermum NRPS encoding gene (SAPIO_CDS8684) was detected with a tBLASTn search. This locus, about 8,1 kb in length, belongs to a cluster of 11 genes spanning about 44 kb, and may encode a protein of 2,708 amino acids (~297 kDa) containing one adenylation, two condensation and one epimerization domains, but surprisingly no peptidyl carrier domain (E1-C1-A1-C2). Best BLASTp matches against A. fumigatus strain Af293 were obtained with proteins coded by pesM, pes1, and pes3 with an overall identity of 28-29%, and reached 45-49% with uncharacterized NRPSs from Colletotrichum or Verticillium species which are phylogenetically close molds of S. apiospermum. A further tBLASTn search found 94% identity with a sequence from Aureobasidium pullulans strain IMV 00882 (locus MSJF01000363, coordinates 40273-48390). Pfam analysis of the translated sequence found a structure similar to that of SAPIO_CDS8684, with the exception of a phosphopantetheine attachment site predicted from Arg1878 to Thr¹⁹⁴⁴, i.e., between the adenylation and the C-terminal condensation domains (E1-C1-A1-T1-C2). When focusing on this predicted thiolation domain, alignment of the two protein sequences showed a high dissimilarity (7/67; 11%). Notably, the sequences differ by three amino acids (A1881S, R1885Q, and A1892K) upstream the first serine residue, which is located in alignment position 1893 (i.e., the 16th amino acid from the T-domain start) (Supplementary Figure S1). Of note, thiolation domains, which are composed of four *a*-helices, contain a conserved serine residue that is the site of addition of the phosphopantetheine group (Miller and Gulick, 2016). This serine residue, which is essential for amino acid loading, is located at the start of helix $\alpha 2$. Thus, one may speculate that this particular sequence of the protein encoded by SAPIO_CDS8684 might have caused conformational changes that unable any amino acid to be covalently tethered to the assembly line, explaining why no thiolation domain was recognized by bioinformatics tools.

CONCLUSION

The present study shows that *S. apiospermum* harbors nine NRPS gene clusters putatively involved in the synthesis of

REFERENCES

Baranašić, D., Zucko, J., Diminic, J., Gacesa, R., Long, P. F., Cullum, J., et al. (2014). Predicting substrate specificity of adenylation domains of nonribosomal peptide synthetases and other protein properties by latent semantic indexing. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 41, 461–467. doi: 10.1007/s10295-013-1322-1322

epidithiodioxopiperazines, siderophores, cyclopeptides or other still uncharacterized specialized metabolites. However, the current sequence similarity-based methods were often unable to produce reliable predictions for NRPSs substrate specificity, thus questioning about the precise structure of the peptide produced by each NRPS. Nevertheless, our research group already evidenced the production of an extracellular siderophore in S. apiospermum, while others showed the biosynthesis of some immunoevasive epidithiodioxopiperazine secondary metabolites (Wu et al., 2014; Lan et al., 2016) and some toxic cyclohexapeptide compounds (Pavlaskova et al., 2010) in its sister species S. boydii, which reinforces the role played by these genes. Works are in progress to identify all the NRPs produced by S. apiospermum and their respective role in pathogenicity of the fungus. Indeed, inhibition of these biosynthetic pathways could lead to attenuated virulence or protection of the fungus against the host immune defenses. Moreover, NRPSs are not synthesized by human cells, and may therefore represent interesting targets for future drug development, especially against life-threatening molds such as Scedosporium species.

DATA AVAILABILITY

All datasets generated for this study are included in the manuscript and/or the **Supplementary Files**.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YG, J-PB, and PV conceived and designed the bioinformatics experiments. YG and PV performed the experiments. YG, NP, SLG and PV analyzed the data. YG wrote the first draft of the manuscript. All the authors contributed to manuscript revision, read, and approved the submitted version.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb. 2019.02062/full#supplementary-material

FIGURE S1 | Amino acid sequence alignment of the proteins encoded by SAPIO_CDS8684 and APUL_MSJF01000363. Alignment starts at position 1 on both translated sequences. The black box denotes the predicted thiolation domain for APUL_MSJF01000363, while the arrow shows a conserved serine residue which could be the attachment site of the phosphopantetheine group. Amino acids colored in black and blue indicate the dissimilarities between the two sequences.

- Bertrand, S., Larcher, G., Landreau, A., Richomme, P., Duval, O., and Bouchara, J.-P. (2009). Hydroxamate siderophores of *Scedosporium apiospermum. Biometals* 22, 1019–1029. doi: 10.1007/s10534-009-9253-9250
- Blyth, C. C., Middleton, P. G., Harun, A., Sorrell, T. C., Meyer, W., and Chen, S. C.-A. (2010). Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med. Mycol.* 48(Suppl. 1), S37–S44. doi: 10.3109/13693786.2010.500627

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

Non-ribosomal Peptide Synthesis in Scedosporium apiospermum

- Bok, J. W., Chung, D., Balajee, S. A., Marr, K. A., Andes, D., Nielsen, K. F., et al. (2006). GliZ, a transcriptional regulator of gliotoxin biosynthesis, contributes to Aspergillus fumigatus virulence. Infect. Immun. 74, 6761–6768. doi: 10.1128/ IAI.00780-786
- Bushley, K. E., Raja, R., Jaiswal, P., Cumbie, J. S., Nonogaki, M., Boyd, A. E., et al. (2013). The genome of *Tolypocladium inflatum*: evolution, organization, and expression of the cyclosporin biosynthetic gene cluster. *PLoS Genet*. 9:e1003496. doi: 10.1371/journal.pgen.1003496
- Bushley, K. E., Ripoll, D. R., and Turgeon, B. G. (2008). Module evolution and substrate specificity of fungal nonribosomal peptide synthetases involved in siderophore biosynthesis. *BMC Evol. Biol.* 8:328. doi: 10.1186/1471-2148-8-328
- Chen, H., and Walsh, C. T. (2001). Coumarin formation in novobiocin biosynthesis: beta-hydroxylation of the aminoacyl enzyme tyrosyl-S-NovH by a cytochrome P450 NovI. *Chem. Biol.* 8, 301–312. doi: 10.1016/s1074-5521(01) 00009-6
- 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.* 19, 53–56. doi: 10.1007/ s100960050011
- Coron, N., Pihet, M., Fréalle, E., Lemeille, Y., Pinel, C., Pelloux, H., et al. (2018). Toward the standardization of mycological examination of sputum samples in cystic fibrosis: results from a French multicenter prospective study. *Mycopathologia* 183, 101–117. doi: 10.1007/s11046-017-0173-171
- Cortez, K. J., Roilides, E., Quiroz-Telles, F., Meletiadis, J., Antachopoulos, C., Knudsen, T., et al. (2008). Infections caused by *Scedosporium* spp. *Clin. Microbiol. Rev.* 21, 157–197. doi: 10.1128/CMR.00039-37
- Cramer, R. A., Stajich, J. E., Yamanaka, Y., Dietrich, F. S., Steinbach, W. J., and Perfect, J. R. (2006). Phylogenomic analysis of non-ribosomal peptide synthetases in the genus *Aspergillus. Gene* 383, 24–32. doi: 10.1016/j.gene.2006. 07.008
- Dolan, S. K., Owens, R. A., O'Keeffe, G., Hammel, S., Fitzpatrick, D. A., Jones, G. W., et al. (2014). Regulation of nonribosomal peptide synthesis: bisthiomethylation attenuates gliotoxin biosynthesis in Aspergillus fumigatus. Chem. Biol. 21, 999–1012. doi: 10.1016/j.chembiol.2014.07.006
- Dopstadt, J., Neubauer, L., Tudzynski, P., and Humpf, H.-U. (2016). The epipolythiodiketopiperazine gene cluster in *Claviceps purpurea*: cysfunctional cytochrome P450 enzyme prevents formation of the previously unknown clapurines. *PLoS One* 11:e0158945. doi: 10.1371/journal.pone.0158945
- Edgar, R. C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32, 1792–1797. doi: 10.1093/nar/gk h340
- Felnagle, E. A., Jackson, E. E., Chan, Y. A., Podevels, A. M., Berti, A. D., McMahon, M. D., et al. (2008). Nonribosomal peptide synthetases involved in the production of medically relevant natural products. *Mol. Pharm.* 5, 191–211. doi: 10.1021/mp700137g
- Finking, R., and Marahiel, M. A. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. Annu. Rev. Microbiol. 58, 453–488. doi: 10.1146/annurev.micro.58.030603. 123615
- Fox, E. M., and Howlett, B. J. (2008). Biosynthetic gene clusters for epipolythiodioxopiperazines in filamentous fungi. *Mycol. Res.* 112, 162–169. doi: 10.1016/j.mycres.2007.08.017
- Franken, A. C. W., Lechner, B. E., Werner, E. R., Haas, H., Lokman, B. C., Ram, A. F. J., et al. (2014). Genome mining and functional genomics for siderophore production in *Aspergillus niger. Brief. Funct. Genomics* 13, 482–492. doi: 10. 1093/bfgp/elu026
- Gardiner, D. M., Cozijnsen, A. J., Wilson, L. M., Pedras, M. S. C., and Howlett, B. J. (2004). The sirodesmin biosynthetic gene cluster of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*: sirodesmin biosynthetic gene cluster. *Mol. Microbiol.* 53, 1307–1318. doi: 10.1111/j.1365-2958.2004.04215.x
- Gardiner, D. M., and Howlett, B. J. (2005). Bioinformatic and expression analysis of the putative gliotoxin biosynthetic gene cluster of Aspergillus fumigatus. FEMS Microbiol. Lett. 248, 241–248. doi: 10.1016/j.femsle.2005.05.046
- Giuliano Garisto Donzelli, B., Krasnoff, S. B., Moon, Y.-S., Sun-Moon, Y., Churchill, A. C. L., and Gibson, D. M. (2012). Genetic basis of destruxin production in the entomopathogen *Metarhizium robertsii. Curr. Genet.* 58, 105–116. doi: 10.1007/s00294-012-0368-364
- Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W., and Gascuel, O. (2010). New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood

phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Syst. Biol. 59, 307–321. doi: 10.1093/sysbio/syq010

- Guo, C.-J., Yeh, H.-H., Chiang, Y.-M., Sanchez, J. F., Chang, S.-L., Bruno, K. S., et al. (2013). Biosynthetic pathway for the epipolythiodioxopiperazine acetylaranotin in *Aspergillus terreus* revealed by genome-based deletion analysis. J. Am. Chem. Soc. 135, 7205–7213. doi: 10.1021/ja3123653
- Haas, H. (2014). Fungal siderophore metabolism with a focus on Aspergillus fumigatus. Nat. Prod. Rep. 31, 1266–1276. doi: 10.1039/c4np00071d
- Horré, R., Marklein, G., Siekmeier, R., Nidermajer, S., and Reiffert, S. M. (2009). Selective isolation of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species from respiratory tract specimens of cystic fibrosis patients. *Respiration* 77, 320–324. doi: 10.1159/000167419
- Knudsen, M., Søndergaard, D., Tofting-Olesen, C., Hansen, F. T., Brodersen, D. E., and Pedersen, C. N. S. (2016). Computational discovery of specificityconferring sites in non-ribosomal peptide synthetases. *Bioinformatics* 32, 325– 329. doi: 10.1093/bioinformatics/btv600
- Lan, W.-J., Wang, K.-T., Xu, M.-Y., Zhang, J.-J., Lam, C.-K., Zhong, G.-H., et al. (2016). Secondary metabolites with chemical diversity from the marine-derived fungus *Pseudallescheria boydii* F19-1 and their cytotoxic activity. *RSC Adv.* 6, 76206–76213. doi: 10.1039/C6RA06661E
- Le Govic, Y., Papon, N., Le Gal, S., Lelièvre, B., Bouchara, J.-P., and Vandeputte, P. (2018). Genomic organization and expression of iron metabolism genes in the emerging pathogenic mold *Scedosporium apiospermum. Front. Microbiol.* 9:827. doi: 10.3389/fmicb.2018.00827
- Letunic, I., and Bork, P. (2016). Interactive tree of life (iTOL) v3: an online tool for the display and annotation of phylogenetic and other trees. *Nucleic Acids Res.* 44, W242–W245. doi: 10.1093/nar/gkw290
- Masoud-Landgraf, L., Badura, A., Eber, E., Feierl, G., Marth, E., and Buzina, W. (2014). Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. *Med. Mycol.* 52, 179–186. doi: 10.3109/13693786.2013. 792438
- Medema, M. H., Blin, K., Cimermancic, P., de Jager, V., Zakrzewski, P., Fischbach, M. A., et al. (2011). antiSMASH: rapid identification, annotation and analysis of secondary metabolite biosynthesis gene clusters in bacterial and fungal genome sequences. *Nucleic Acids Res.* 39, W339–W346. doi: 10.1093/nar/gkr466
- Miller, B. R., and Gulick, A. M. (2016). Structural biology of nonribosomal peptide synthetases. *Methods Mol. Biol.* 1401, 3–29. doi: 10.1007/978-1-4939-3375-4_1
- Munawar, A., Marshall, J. W., Cox, R. J., Bailey, A. M., and Lazarus, C. M. (2013). Isolation and characterisation of a ferrirhodin synthetase gene from the sugarcane pathogen *Fusarium sacchari*. *Chembiochem* 14, 388–394. doi: 10.1002/cbic.201200587
- Oide, S., Berthiller, F., Wiesenberger, G., Adam, G., and Turgeon, B. G. (2014). Individual and combined roles of malonichrome, ferricrocin, and TAFC siderophores in *Fusarium graminearum* pathogenic and sexual development. *Front. Microbiol.* 5:759. doi: 10.3389/fmicb.2014.00759
- Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K., et al. (2006). NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophoremediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell* 18, 2836–2853. doi: 10.1105/tpc.106.045633
- Pavlaskova, K., Nedved, J., Kuzma, M., Zabka, M., Sulc, M., Sklenar, J., et al. (2010). Characterization of pseudacyclins A-E, a suite of cyclic peptides produced by *Pseudallescheria boydii. J. Nat. Prod.* 73, 1027–1032. doi: 10.1021/np900472c
- Ramirez-Garcia, A., Pellon, A., Rementeria, A., Buldain, I., Barreto-Bergter, E., Rollin-Pinheiro, R., et al. (2018). Scedosporium and Lomentospora: an updated overview of underrated opportunists. Med. Mycol. 56, 102–125. doi: 10.1093/ mmy/myx113
- Scharf, D. H., Habel, A., Heinekamp, T., Brakhage, A. A., and Hertweck, C. (2014). Opposed effects of enzymatic gliotoxin N- and S-methylations. J. Am. Chem. Soc. 136, 11674–11679. doi: 10.1021/ja5033106
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., et al. (2007). Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog.* 3:e128. doi: 10.1371/journal.ppat.0030128
- Schrettl, M., Winkelmann, G., and Haas, H. (2004). Ferrichrome in Schizosaccharomyces pombe-an iron transport and iron storage compound. Biometals 17, 647–654. doi: 10.1007/s10534-004-1230-z
- Schwarz, C., Brandt, C., Antweiler, E., Krannich, A., Staab, D., Schmitt-Grohé, S., et al. (2017). Prospective multicenter German study on pulmonary colonization with *Scedosporium/Lomentospora* species in cystic fibrosis: epidemiology and

Frontiers in Microbiology | www.frontiersin.org

13

September 2019 | Volume 10 | Article 2062

Non-ribosomal Peptide Synthesis in Scedosporium apiospermum

new association factors. $PLoS\ One$ 12:e0171485. doi: 10.1371/journal.pone. 0171485

- Schwarz, C., Brandt, C., Whitaker, P., Sutharsan, S., Skopnik, H., Gartner, S., et al. (2018). Invasive pulmonary fungal infections in cystic fibrosis. *Mycopathologia* 183, 33–43. doi: 10.1007/s11046-017-0199-194
- Schwecke, T., Göttling, K., Durek, P., Dueñas, I., Käufer, N. F., Zock-Emmenthal, S., et al. (2006). Nonribosomal peptide synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* and the architectures of ferrichrome-type siderophore synthetases in fungi. *Chembiochem* 7, 612–622. doi: 10.1002/cbic.200500301
- 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, 237–241. doi: 10.1016/j.jcf.2014.12.014
- Sun, W.-W., Romsdahl, J., Guo, C.-J., and Wang, C. C. (2018). Genomebased deletion analysis in Aspergillus terreus reveals the acetylaranotin bisthiomethyltransferase gene. Fungal Genet. Biol. 119, 1–6. doi: 10.1016/j.fgb. 2018.08.001
- Süssmuth, R., Müller, J., von Döhren, H., and Molnár, I. (2011). Fungal cyclooligomer depsipeptides: from classical biochemistry to combinatorial biosynthesis. *Nat. Prod. Rep.* 28, 99–124. doi: 10.1039/c001463j
- Vaillancourt, F. H., Yeh, E., Vosburg, D. A., O'Connor, S. E., and Walsh, C. T. (2005). Cryptic chlorination by a non-haem iron enzyme during cyclopropyl amino acid biosynthesis. *Nature* 436, 1191–1194. doi: 10.1038/nature03797
- 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:e0988-14. doi: 10.1128/genomeA.0098 8-914
- Walsh, C. T., Chen, H., Keating, T. A., Hubbard, B. K., Losey, H. C., Luo, L., et al. (2001). Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 5, 525–534. doi: 10.1016/s1367-5931(00)00235-0
- Wang, B., Kang, Q., Lu, Y., Bai, L., and Wang, C. (2012). Unveiling the biosynthetic puzzle of destruxins in *Metarhizium* species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 1287–1292. doi: 10.1073/pnas.1115983109

- Welzel, K., Eisfeld, K., Antelo, L., Anke, T., and Anke, H. (2005). Characterization of the ferrichrome A biosynthetic gene cluster in the homobasidiomycete *Omphalotus olearius. FEMS Microbiol. Lett.* 249, 157–163. doi: 10.1016/j.femsle. 2005.06.013
- Wilkinson, B., and Micklefield, J. (2009). Chapter 14. Biosynthesis of nonribosomal peptide precursors. *Methods Enzymol.* 458, 353–378. doi: 10.1016/S0076-6879(09)04814-4819
- Wu, Q., Jiang, N., Bo Han, W., Ning Mei, Y., Ming Ge, H., Kai Guo, Z., et al. (2014). Antibacterial epipolythiodioxopiperazine and unprecedented sesquiterpene from *Pseudallescheria boydii*, a beetle (coleoptera)associated fungus. *Org. Biomol. Chem.* 12, 9405–9412. doi: 10.1039/c4ob01 494d
- Xu, Y., Orozco, R., Wijeratne, E. M. K., Gunatilaka, A. A. L., Stock, S. P., and Molnár, I. (2008). Biosynthesis of the cyclooligomer depsipeptide beauvericin, a virulence factor of the entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana*. *Chem. Biol.* 15, 898–907. doi: 10.1016/j.chembiol.2008.07.011
- Yue, Q., Chen, L., Zhang, X., Li, K., Sun, J., Liu, X., et al. (2015). Evolution of chemical diversity in echinocandin lipopeptide antifungal metabolites. *Eukaryot. Cell* 14, 698–718. doi: 10.1128/EC.00076-15
- Ziesing, S., Suerbaum, S., and 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: 10.1093/mmy/myw035

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Le Govic, Papon, Le Gal, Bouchara and Vandeputte. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

	1821	1830	1840	1850	1860	1870	1880	1890	1900	1910	1920	1930	1940	1950
SAPIO_CDS8684	PIRSF	PHTPSLK	IHRRKLOKMAS	ALSEAELIG	ASASHPEGI		QVEERMRSI		ISGTOSFYRL	GGDVHL VAK		IRLCDYLRNN	LSLTDLCQS	ITLSEERI
HPUL_021F01000363	PIRSF	PHIPSLE	THREETORUHS	VLSENELIG	-HOHOHPEGIN	TPUTKPLPL	INAFEKUKHTI	(HRLLEYUPH:	L SUTUSFYKL	GODAHE AHRI	LYYHUKKEULY	TKLOUYLKNN	ILSETULUUS.	LIEEKY

Figure S1: Amino acid sequence alignment of the proteins encoded by SAPIO_CDS8684 and APUL_MSJF01000363 from *Scedosporium apiospermum* strain IHEM 14462 and *Aureobasidium pullulans* strain IMV 00882, respectively. Alignment starts at position 1 on both translated sequences. The black box denotes the predicted thiolation domain for APUL_MSJF01000363, while the arrow shows a conserved serine residue which could be the attachment site of the phosphopantetheine group. Amino acids colored in black and blue indicate the dissimilarities between the two sequences.

3. Caractérisation fonctionnelle du gène sidD

Pour confirmer les résultats de prédiction précédemment obtenus pour la synthèse de sidérophores chez *Scedosporium apiospermum*, nous nous sommes proposés de générer des souches mutantes pour les gènes de NRPS afin de caractériser les peptides effectivement produits par ces gènes, mais aussi d'étudier leur rôle dans la croissance et la virulence du champignon. Nos expériences ont permis de générer trois mutants indépendants pour le locus *sidD* (SAPIO_CDS2806) potentiellement impliqué dans la synthèse d'un sidérophore excrété. L'étude des caractéristiques de la souche parentale et des mutants pour le locus *sidD* a fait l'objet de deux collaborations, l'une avec l'équipe du Pr. Vladimir Havlíček (Prague, République Tchèque) visant à déterminer la structure chimique du sidérophore produit, l'autre avec l'équipe du Pr. Javier Capilla (Reus, Espagne) afin de préciser le rôle du gène *sidD* dans la virulence sur un modèle murin de scédosporiose disséminée.

Les résultats de ce travail ont été acceptés pour publication dans la revue *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* le 08 octobre 2020.

3.1. Résumé

La capacité des champignons à accéder aux ressources en fer constitue un facteur clé de leur virulence. Nous avons montré précédemment que *Scedosporium apiospermum* possède l'information génétique nécessaire à la synthèse de sidérophores, notamment un orthologue du gène *sidD* qui contrôle la production de fusarinine C chez *Aspergillus fumigatus*. L'objectif était ici de déterminer la structure du peptide produit par le gène *sidD* de *S. apiospermum* et d'évaluer son importance pour la croissance et la virulence du champignon.

Le gène *sidD* a été disrupté chez la souche *S. apiospermum* IHEM14462 (WT) préalablement invalidée pour le gène ku70, et la détection de sidérophores a été réalisée sur des lyophilisats de filtrats de culture sur milieu Yeast Nitrogen Base (YNB). L'impact de la délétion de *sidD* a été étudié sur milieu gélosé contenant un chélateur de fer (BPS) et supplémenté avec des lyophilisats de filtrats de culture des souches WT ou $\Delta sidD$. L'assimilation du fer lié aux xénosidérophores (sidérophores produits par d'autres organismes) a également été testée en utilisant le ferrichrome, la ferrioxamine ou la pyoverdine comme unique source de fer. Enfin, la virulence a été évaluée sur un modèle murin de scédosporiose disséminée.

Au total, trois mutants ont été générés pour le locus d'intérêt. L'analyse comparative des filtrats de culture des souches WT et $\Delta sidD$ a révélé un unique sidérophore, le N^{α} -méthylcoprogène B dont l'absence chez les mutants $\Delta sidD$ entraîne une perte quasi-totale de croissance en condition de carence martiale. Celle-ci est restaurée par supplémentation du milieu de culture par un filtrat de culture de la souche WT, alors que l'incorporation dans le milieu carencé d'un filtrat de culture d'un mutant $\Delta sidD$ est sans effet, corroborant ainsi les analyses biochimiques. Le ferrichrome ou la ferrioxamine permettent une croissance normale de l'ensemble des souches, indiquant leur assimilation directe. Inversement, la pyoverdine favorise uniquement la croissance de la souche WT, suggérant l'appropriation du fer de la pyoverdine *via* le N^{α} -méthylcoprogène B. Enfin, l'invalidation de *sidD* entraîne une réduction drastique de la virulence.

Cette étude montre que le gène *sidD* contrôle la synthèse de N^{α} -méthylcoprogène B, sidérophore essentiel pour la croissance et la virulence des *Scedosporium*, qui permet également l'acquisition du fer initialement lié à la pyoverdine, ce qui pourrait expliquer l'antagonisme rapporté entre les *Scedosporium* et le bacille pyocyanique dans la mucoviscidose.

3.2. Article


ORIGINAL RESEARCH published: 28 October 2020 doi: 10.3389/fcimb.2020.587909



Synthesis of the Hydroxamate Siderophore N^{α} -Methylcoprogen B in Scedosporium apiospermum Is Mediated by sidD Ortholog and Is Required for Virulence

Yohann Le Govic^{1,2*†}, Vladimir Havlíček³, Javier Capilla⁴, Dominika Luptáková³, Dayana Dumas⁴, Nicolas Papon¹, Solène Le Gal^{1,5}, Jean-Philippe Bouchara^{1,2‡} and Patrick Vandeputte^{1,2†‡}

¹ Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène (GEIHP, EA 3142), SFR ICAT 4208, Université Angers, Université Brest, Angers, France, ² Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Angers, France, ³ Institute of Microbiology of the Czech Academy of Sciences, Prague, Czech Republic, ⁴ Unitat de Microbiologia, Facultat de Medicina i Ciències de la Salut, Universitat Rovira i Virgili and Institut d'Investigació Sanitària Pere Virgili (IISPV), Reus, Spain, ⁵ Laboratoire de Parasitologie-Mycologie, Centre Hospitalier Universitaire, Brest, France

Scedosporium species rank second among the filamentous fungi capable to colonize chronically the respiratory tract of patients with cystic fibrosis (CF). Nevertheless, there is little information on the mechanisms underpinning their virulence. Iron acquisition is critical for the growth and pathogenesis of many bacterial and fungal genera that chronically inhabit the CF lungs. In a previous study, we showed the presence in the genome of Scedosporium apiospermum of several genes relevant for iron uptake, notably SAPIO_CDS2806, an ortholog of sidD, which drives the synthesis of the extracellular hydroxamate-type siderophore fusarinine C (FsC) and its derivative triacetylfusarinine C (TAFC) in Aspergillus fumigatus. Here, we demonstrate that Scedosporium apiospermum sidD gene is required for production of an excreted siderophore, namely, N^{α} methylcoprogen B, which also belongs to the hydroxamate family. Blockage of the synthesis of N^{α} -methylcoprogen B by disruption of the sidD gene resulted in the lack of fungal growth under iron limiting conditions. Still, growth of AsidD mutants could be restored by supplementation of the culture medium with a culture filtrate from the parent strain, but not from the mutants. Furthermore, the use of xenosiderophores as the sole source of iron revealed that S. apiospermum can acquire the iron using the hydroxamate siderophores ferrichrome or ferrioxamine, i.e., independently of N^{α} -methylcoprogen B production. Conversely, N^{α} -methylcoprogen B is mandatory for iron acquisition from pyoverdine, a mixed catecholate-hydroxamate siderophore. Finally, the deletion of sidD resulted in the loss of virulence in a murine model of scedosporiosis. Our findings demonstrate that S. apiospermum sidD gene drives the synthesis of a unique extracellular, hydroxamate-type iron chelator, which is essential for fungal growth and virulence. This compound scavenges iron from pyoverdine, which might explain why

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology | www.frontiersin.org

1

October 2020 | Volume 10 | Article 587909

OPEN ACCESS

Edited by: Guilhem Janbon, Institut Pasteur, France

Reviewed by:

Taissa Vila, Federal University of Rio de Janeiro, Brazil Hubertus Haas, Innsbruck Medical University, Austria

*Correspondence:

Yohann Le Govic legovic.yohann@chu-amiens.fr

[†]Present address:

Yohann Le Govic, Parasitology and Mycology Department, University Hospital of Amiens-Picardie, Amiens, France Patrick Vandeputte, Vascular Medicine, University Hospital Center, Angers, France

[‡]These authors have contributed equally to this work

Specialty section:

This article was submitted to Fungal Pathogenesis, a section of the journal Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

Received: 27 July 2020 **Accepted:** 08 October 2020 **Published:** 28 October 2020

Citation:

Le Govic Y, Havlíček V, Capilla J, Luptáková D, Dumas D, Papon N, Le Gal S, Bouchara J-P and Vandeputte P (2020) Synthesis of the Hydroxamate Siderophore N^{rc}-Methylcoprogen B in Scedosporium apiospermum Is Mediated by sidD Ortholog and Is Required for Virulence. Front. Cell. Infect. Microbiol. 10:587909. doi: 10.3389/fcimb.2020.587909

S. apiospermum and *Pseudomonas aeruginosa* are rarely found simultaneously in the CF lungs.

Keywords: Scedosporium, iron uptake, extracellular siderophore, N^{α} -methyl coprogen B, virulence factor, xenosiderophores, cystic fibrosis

INTRODUCTION

During the past few decades, opportunistic fungal pathogens from the genus *Scedosporium* have been increasingly recognized as the cause of potentially life-threatening infections in immunocompromised patients (Ramirez-Garcia et al., 2018). Likewise, a high occurrence was observed among patients with other underlying conditions such as cystic fibrosis (CF). These molds indeed represent the second most common filamentous fungi inhabiting the CF airways, after *Aspergillus fumigatus*. Nevertheless, there is only little information about the critical virulence determinants driving *Scedosporium* persistence, infection, and morbidity in the CF context.

Like bacteria, the survival of fungi is dependent upon their ability to acquire metals that function as cofactors of almost onethird of their proteins (Waldron and Robinson, 2009). Among these metals, iron is essential for nearly all living organisms due to its crucial role in many enzymes and metabolic processes. In the human host, the amount of available free iron is meager (10⁻²⁴ M) (Caza and Kronstad, 2013) because of (i) the poor solubility of the metal ion in its highest oxidation state (Fe³⁺), which is the predominant form of iron in aerobic environments at physiological pH; and (ii) its sequestration by host proteins such as ferritin, transferrin, and hemoglobin. Consequently, pathogenic organisms had evolved sophisticated mechanisms to ensure adequate iron supply for cellular processes. Siderophore production is thought to be the primary mechanism used for iron uptake in Aspergillus species as they cannot acquire iron directly from heme, ferritin, or transferrin. For instance, Schrettl et al. (2004) demonstrated that the non-siderophore reductive iron assimilation (RIA) system, presenting high affinity for ferric iron, was dispensable for the establishment of infection in a murine model of invasive aspergillosis, while disruption of the genes involved in siderophore biosynthesis resulted in a dramatic reduction of growth and virulence (Schrettl et al., 2004; Schrettl et al., 2007; Yasmin et al., 2012).

Siderophores are non-ribosomal peptides (NRPs), which have been classified as catecholate, carboxylate, hydroxamate, and mixed types, according to the functional group(s) involved in iron chelation. Most fungi produce hydroxamate-type siderophores using acylated N^5 -hydroxy-L-ornithine as building blocks (Haas, 2014). In these siderophores bearing the functional group RC(O)N(OH)R'—with R and R' as organic residues and CO as a carbonyl group—the building blocks bind to ferric ions as bidentate ligands through their oxygen atoms. To further increase their affinity for Fe³⁺, the vast majority of fungal siderophores include three hydroxamate moieties linked covalently by peptide or ester bonds to form hexadentate complexes, satisfying the six-coordinate octahedral geometry preferred for ferric ions. These structures exhibit high dissociation constants ranging from 10^{-22} to 10^{-32} M (Winkelmann, 2007), which corresponds to an affinity that surpasses that of all other biologically relevant iron ligands. For example, *Aspergillus fumigatus* secretes two hexadentate hydroxamate siderophores, namely, fusarinine C (FsC) and triacetylfusarinine C (TAFC), which have a higher affinity for iron than transferrin so that the fungus can obtain iron directly from the host protein (Hissen et al., 2004).

In a previous study, we demonstrated that the Scedosporium apiospermum genome comprises several genes orthologous to those required for siderophore production in A. fumigatus (Le Govic et al., 2018), notably the NPS6 ortholog of A. fumigatus sidD gene encoding a nonribosomal peptide synthetase (NRPS), which is involved in the last step of FsC synthesis (Schrettl et al., 2007). In the fungal kingdom, sidD orthologs were described to be responsible not only for the synthesis of fusarinine- but also of coprogen-derived siderophores. Bioinformatic investigations showed that S. apiospermum sidD gene (SAPIO_CDS2806) encodes a putative NRPS whose architecture resembles that of coprogen- or fusarinine-type siderophore-producing NRPSs (Le Govic et al., 2019). Accordingly, phylogenetic analysis revealed that the protein encoded by S. apiospermum sidD belongs to the NPS6/SidD family, which gathers NRPS members driving the biosynthesis of extracellular siderophores, including coprogen and fusarinine NRPSs (Le Govic et al., 2019). However, none of the NRPS in silico analysis tools was able to predict the nature of the substrates of S. apiospermum SidD. The aims of this study were, therefore, (i) to determine if S. apiospermum sidD is responsible for the biosynthesis of an extracellular siderophore, (ii) to identify the compound produced, and (iii) to assess the importance of this compound in fungal growth and virulence.

MATERIALS AND METHODS

Strains and Culture Conditions

The S. apiospermum wild-type (WT) strain used in this study, deposited at the BCCM/IHEM culture collection (Brussels, Belgium) under the accession number IHEM 14462, was isolated in 1998 from a sputum sample from a CF patient in Tours, France. As described below, a non-homologous end-joining-deficient strain ($\Delta ku70$) was obtained from this WT strain, and was subsequently used to generate *sidD* disruptants.

Strains were maintained by regular passages on Potato Dextrose Agar (PDA) plates supplemented with 0.5% chloramphenicol. For cultivation of the $\Delta ku70$ parent strain and the $\Delta sidD$ disruptants, phleomycin (20 µg/ml) and hygromycin B (50 µg/ml) were also added to the culture medium, respectively, in order to maintain the selection pressure.

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology | www.frontiersin.org

Genomic DNA Extraction

Fresh mycelia were collected from 9-day-old cultures grown on PDA plates. After grinding in liquid nitrogen and addition of a 10 mM Tris-HCl lysis buffer (pH 8) supplemented with 1 mM EDTA, 2% Triton X100, 1% SDS, and 0.1 M NaCl, the total genomic DNA was extracted by the addition of an equal volume of phenol:chloroform:isopropanol (25:24:1; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Mi) and chloroform/isoamyl alcohol (24:1; Sigma-Aldrich), and then precipitated by the addition of 2 volumes of 100% ethanol. After washing with 70% ethanol and digestion of RNA with 0.2 mg/mL RNase A, DNA was quantified on a Qubit[®] 2.0 Fluorometer (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and integrity was checked by 1% agarose gel electrophoresis. Genomic DNA was stored in TE buffer at 4°C.

Plasmid Construction

Two constructions were prepared to produce the double mutant deficient for the genes encoding the Ku70 subunit and the NRPS SidD.

For prior disruption of the KU70 gene, transforming DNA was obtained by PCR amplification of a fragment containing the whole KU70 coding sequence of S. apiospermum (SAPIO_CDS7374), together with its upstream (1169 bp) and downstream (1986 pb) flanking sequences. The primers used for PCR (SaKU70-F-BamHI and SaKU70-R-ClaI; Supplementary Table 1) contained BamHI and ClaI restriction sites. This allowed to clone the PCR product into plasmid pBluescript II KS(+) (Agilent, Les Ulis, France) at the corresponding restriction sites, which led to plasmid pPV221. Then the ORF corresponding to KU70 within pPV221 was interrupted and substituted in part by a SbfI/StuI fragment from the pAN8-1 plasmid [1479914] containing the phleomycin resistance gene (BLE), leading to plasmid pPV229. Transforming DNA (10 µg) was released from pPV229 by digestion with SpeI and ClaI, and integrated at the KU70 locus as described below.

For disruption of *sidD* gene, the cassette was obtained after cloning the flanking regions within plasmid pPV189, which harbors the hygromycin B resistance gene (*HPH*) as a selection marker. The 5' and 3' flanking regions of *sidD* gene were obtained from DNA from the wild-type strain by PCR amplification using primers SaSidD-5'UTR-F-ClaI and SaSidD-5'UTR-R-HindIII, and primers SaSidD-3'UTR-F-NotI and SaSidD-3'UTR-R-BstXI, respectively (**Supplementary Table 1**). Amplified fragments were digested with primer specific restriction enzymes, i.e., ClaI and HindIII for the 5' upstream PCR product, and NotI and BstXI for the 3' downstream PCR product and finally introduced sequentially in the corresponding sites of the plasmid pPV189 to yield pYLG108.

Fungal Transformation

The transformation was achieved on protoplasts obtained from 24-h-old germ tubes as described by Turgeon et al. (2010) and Liu and Friesen (2012) with 5 μ g of DNA. In brief, germ tubes were first collected by filtration on 20- μ m pore size Miracloth[®] membranes (Merck, Darmstadt, Germany) and incubated at 37°C for 3.5 h under constant shaking (120 rpm) in OM/glucanex

Extracellular Siderophore Production in Scedosporium apiospermum

solution [1.2 M MgSO₄, 10 mM Na₂HPO₄ (pH 5.8), and 12.5 g/L glucanex]. Protoplasts were recovered by centrifugation in a Tris-HCl buffer (10 mM) containing 1.2 M sorbitol to maintain the osmotic pressure, and then stored at 4°C in the same buffer supplemented with 10 mM CaCl₂. The cassette was integrated in protoplasts by heat shock in the presence of polyethylene glycol (PEG). Afterwards protoplasts were poured onto soft agar medium (1 M sucrose, 0.2% yeast extract, 0.2% casaminoacids, and 1.28% molten agar), which was covered 16 h later with the same culture medium supplemented with 20 µg/mL phleomycin or 50 µg/mL hygromycin B, according to the resistance gene used in the disruption cassette. Cultures were incubated for 3 days at 37°C, and transformants capable to grow in the presence of phleomycin or hygromycin B were selected.

Mutants were maintained on PDA supplemented with 0.5% chloramphenicol and 20 μ g/mL phleomycin for the $\Delta ku70$ mutant or with 0.5% chloramphenicol and 50 μ g/mL hygromycin B for the double mutant $\Delta ku70/\Delta sidD$.

Validation of Gene Disruption

Monospore isolates of transformants growing in the presence of 20 µg/mL phleomycin or 50 µg/mL hygromycin B were subcultured, and their genotype was analyzed by Southern blot as previously described (Pateau et al., 2018) to confirm the integration of the disruption cassette at the target locus. Genomic DNA was extracted and digested overnight with the appropriate restriction enzyme (EcoRI for analysis of the $\Delta ku70$ mutant, and SacI for the double mutant). After separation of the digested genomic DNA by agarose gel electrophoresis, gels were incubated successively in 0.25 N HCl, 1.5 M NaCl/0.5 M NaOH, and finally 0.5 M Tris-HCl (pH 7.5)/1.5 M NaCl. DNA fragments were then transferred on nylon membranes (Amersham HybondTM-N+, GE Healthcare). After crosslinking for 3 min under UV light, gels were incubated overnight at 55°C in the presence of an appropriate probe. The probe was either a double SpeI/StuI digest of pPV229 corresponding to KU70 upstream region for validation of the $\Delta ku70$ mutant (Figure 1A) or a PCR product obtained using SaSidD-3'UTR-F-NotI as forward primer and SaSidD-3'UTR-R-BstXI as the reverse primer (Supplementary Table 1 and Figure **1C**) for validation of the $\Delta k u 70 / \Delta si dD$ double mutant. Each probe was labeled with IllustraTM Shrimp alkaline phosphatase (GE Healthcare life sciences, Chicago, Il) according to the manufacturer's recommendations. Finally, alkaline phosphatase was revealed by the addition of its substrate, and the membrane was imaged by chemiluminescence (LAS4000 GE Healthcare).

Siderophore Detection and Characterization Siderophore Production

Characterization of siderophores was performed on lyophilized filtrates obtained from *S. apiospermum* WT and *AsidD* null-mutant (M1, M2, and M3) strains. At first, conidia were harvested from colonies by aseptically scraping the plates as previously described (Le Govic et al., 2018). Approximately 2×10^7 conidia of each strain were inoculated into 50 ml of Yeast Nitrogen Base medium (0.69% YNB w/o amino acids; ForMedium, Norfolk, UK) supplemented with 2% glucose and 36 μ M FeSO₄. WT strain was cultured with and without the addition of the iron chelator bathophenantroline



and Infection Microbiology | www.frontiersin.org

5

-rontiers in Cellular

disulfonate (BPS, 100 μ M; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France), while the three independent mutants were grown in YNB without BPS. After 48 h at 37°C under agitation (120 rpm), the whole culture flasks were filtered through Miracloth[®] mesh filter to remove hyphae. The filtrates were then clarified by successive passages through 0.45- μ m and 0.22- μ m-pore size membranes (Dominique Dutscher, Brumath, France), split into two parts (~25 ml), and finally lyophilized.

Siderophore Extraction and Purification

Aliquots of each lyophilized sample (20 mg) were resuspended in 1 ml ultra-pure water (UHPLC-MS grade, Honeywell, Germany). Before matrix-assisted laser desorption/ionization Fourier transform ion cyclotron resonance (MALDI FT-ICR) mass spectrometry (MS) analysis, all samples (100 μ l) were desalted by solid-phase extraction with a Sep-Pak C18 cartridge (Waters, Prague, Czech Republic). Briefly, polar contaminants were washed out with 200 μ l of water followed by the extraction of siderophores using 400 μ l of methanol. Extracts were evaporated under vacuum (2 h, 35°C), and solubilized in 100 μ l of 50% acetonitrile (ACN).

MALDI FT-ICR MS Analysis

Two microliters of the prepared solutions were spotted on a ground steel MALDI plate, dried and covered by 1 μl of α-cyano-4hydroxycinnamic acid (CHCA; 10 mg/ml in 50% ACN/0.1% trifluoroacetic acid) matrix. MALDI MS analyses were performed using the Solarix FT-ICR 12T (Bruker Daltonics, USA) mass spectrometer. All measurements were acquired in positive ion mode in a 150–1500 m/z mass range after an external calibration against Pepmix II (Bruker Daltonics) and clusters of CHCA with a mass accuracy better than 2 ppm. To increase ion intensity, the continuous accumulation of selected ions (CASI) mode with a quadrupole-narrowing window in the 500-1000 mass range was used. Desorption/ionization of siderophores was performed using SmartBeam II laser (laser power of 40%, 200 shots, 2 kHz), and instrument parameters was tuned to optimal absolute ion signal intensity. Mass spectra of selected ions were collected at a 1 Da isolation width and 20-25 V collision energy. Final spectra represented an average of 16 or 32 acquired scans. Data were processed using the DataAnalysis software (v.4.1, Bruker Daltonics) and siderophores were annotated in CycloBranch (v.2.0.8) against our databases (Pluháček et al., 2016; Novák et al., 2020).

Cultural Features

All strains were grown on PDA plates containing 100 μ M BPS and supplemented with ~25 ml lyophilized culture filtrates from the WT strain, the $\Delta ku70$ parent strain, or the mutants. The ability of *S. apiospermum* to assimilate iron from xenosiderophores was also assessed by using 20 μ M of iron-saturated ferrichrome, ferrioxamine, or pyoverdine (Sigma-Aldrich) as the sole source of iron. Plates were point-inoculated and then incubated for seven days at 37°C.

Virulence Assay

Virulence of the *S. apiospermum* strains was tested in a murine model of disseminated scedosporiosis. For this purpose,

4-week-old male OF-1 mice (Charles River, Criffa S.A. Barcelona, Spain) weighing 30 g were used. Animals were immunosuppressed 1 day prior infection by intraperitoneal (i.p.) single dose of cyclophosphamide at 200 mg/kg together with intravenous (i.v.) fluorouracil dose at 150 mg/kg. To determine the optimal inoculum size, groups of 5 animals were inoculated i.v. in the lateral vein of the tail with 0.2 ml of a conidial suspension resulting in 2×10^2 , 2×10^3 , 2×10^4 , or 2×10^5 CFU/animal. For the comparison virulence study between WT and knockout strains, inocula consisting on 2 \times 10³ CFU/animal of each fungal strain were injected i.v. via the lateral tail vein in groups of 14 mice (9 for survival and 5 for fungal burden studies) randomly established. To prevent bacterial infections, mice received ceftazidime subcutaneously (5 mg/kg/day). Mortality was recorded twice daily for 20 days. On day 6 post-infection, mice from the fungal burden groups, as well as surviving animals at the end of the experiment, were euthanized for tissue burden determination. Brain, lungs, and kidneys were removed aseptically, weighed and mechanically homogenized in 1 ml of sterile saline. Homogenates were 10fold diluted in sterile saline, and the dilutions were placed onto PDA agar and incubated at 30°C for determination of the fungal load (expressed in CFU per g of tissue). All animal care procedures were supervised and approved by the Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee (protocol number 8248).

RESULTS

Disruption of the *sidD* Gene in *S. apiospermum*

Because of the high frequency of non-homologous recombination events in *S. apiospermum*, all our attempts to produce a $\Delta sidD$ mutant from the wild-type strain failed (data not shown). Therefore, we first produced a mutant strain deficient for the non-homologous end joining (NHEJ) by disruption of the *KU70* gene encoding one of its protein subunits. Almost 20 colonies growing in the presence of 20 µg/ml phleomycin were obtained after transformation of the WT strain IHEM 14462 with the *KU70* deletion cassette. The genotype of monospore isolates obtained from these transformants ($\Delta ku70$) was verified by Southern blot. As illustrated in **Figure 1B**, a band of the expected size (5.6 kbp) was visualized for PV16-A, B, and C monospore isolates after hybridization with the probe, instead of the 3-kbp band observed for the WT strain, thus demonstrating the successful disruption of the *KU70* gene.

The *sidD* gene was then disrupted in the $\Delta ku70$ mutant by introducing the *HPH* resistance gene at the *sidD* locus. A total of twelve clones were randomly selected based on their hygromycin resistance phenotype. Transformant stability was assessed by two successive subcultures on PDA supplemented with 50 µg/ml hygromycin B. All transformants showed resistance to hygromycin B, suggesting that the *HPH* gene was stably maintained in their genome. Genomic DNA of the WT strain and all hygromycin-resistant transformants was then extracted

for molecular characterization. PCR using the primer pair Hph-F and SaSidD-3'UTR-R-BstXI (see primers in **Supplementary Table 1**) led to the amplification of a DNA fragment of the expected size (1,300 bp) for seven out of the 12 transformants (**Figure 1D**). Three PCR-positive transformants (M1, M2, and M3) were randomly selected and further purified by a round of single-spore isolation and two successive subcultures. Finally, southern blot analysis revealed a single band of 1.1 kbp for the WT strain as well as for the $\Delta ku70$ parent strain. In contrast, a 3.7-kbp band was evidenced for the three transformants M1, M2, and M3, as expected for a correct *sidD* gene disruption event (**Figures 1C, E**).

Siderophore Synthesis in S. apiospermum

The *S. apiospermum* WT strain and $\Delta sidD$ mutants were examined for the production of siderophores by the high-resolution MALDI MS analysis. This analysis was performed on lyophilized filtrates obtained from the WT strain and $\Delta sidD$ mutants (M1, M2, and M3) grown in minimal YNB medium under iron-sufficient and/or iron-depleted conditions.

Analysis of the extracellular siderophores performed on culture filtrate from the WT strain revealed one possible candidate against the siderophore/secondary metabolites database, namely, N^{α} -methylcoprogen B (C₃₄H₅₆N₆O₁₂) both in desferri- (*m*/z 741.403, [M+H]⁺) and ferri- (*m*/z 794.314,

(M+Fe-2H)⁺) forms (Figure 2A). Characterization of these ions was further confirmed by their tandem MS fragmentation patterns (Figures 2C, D) compared with the literature (Antelo et al., 2006; Bertrand et al., 2009). Besides, the alkali ion metal attachments were common in desferri- or ferriforms (Supplementary Video 1). CycloBranch annotated [M+H]⁺, [M+Na]⁺, [M+K]⁺, [M+Fe-2H]⁺, [M+Fe+Na-3H]⁺, or [M+Fe+K-3H]⁺ ions, some of them also accompanied with less abundant isotopes ($^{54}\!\mathrm{Fe},\,^{41}\!\mathrm{K}$). Interestingly, the intensity of the 741.403 compound (protonated desferri- N^{α} -methylcoprogen B) did not increase in the culture filtrate from WT grown in the presence of BPS. The most likely explanation is that N^{α} -methylcoprogen B is able to extract iron from BPS, which therefore does not create a massive iron starvation. Conversely, another signal at m/z 424.05 increased, which could be related to BPS. A compound at m/z 742.406 was also seen in the culture filtrate of the WT strain, belonging to the isotopic structure (A+1 ion) of the desferri- N^{α} -methylcoprogen compound as the first isotope, which differs in neutron number regarding the monoisotopic mass 741.403. Of note, N^{α} methylcoprogen B was absent in all AsidD mutants, indicating that sidD gene is essential for its synthesis (Figure 2B). Moreover, other siderophores like FsC or TAFC, as well as dimerumic acid, were not found in any of the samples.

The impact of *sidD* deletion was then investigated by cultivating the fungus on PDA plates containing BPS and



Frontiers in Cellular and Infection Microbiology | www.frontiersin.org

October 2020 | Volume 10 | Article 587909

supplemented with culture filtrates from either the WT strain or the mutants. The disruption of *sidD* resulted in the absence of growth under iron-restricted conditions (**Figures 3A, B**). In contrast, growth could be restored by supplementation of the culture medium (PDA + BPS) with a culture filtrate from the WT strain (**Figure 3C**). Conversely, incorporation of lyophilized filtrates from the mutants in the culture medium did not rescue hyphal development (**Figure 3D**), corroborating the biochemical analyses, i.e., abrogation of extracellular siderophore biosynthesis following inactivation of *sidD*. Furthermore, iron supplementation alone (20 μ M) partially reversed the inhibitory effect of BPS on hyphal development, with mutant growth oriented towards the WT strain and the $\Delta ku70$ parent strain, suggesting siderophore piracy (**Figure 3E**).

Finally, the ability of *S. apiospermum* to assimilate iron from xenosiderophores was assessed by using Fe(III)-saturated

ferrichrome, ferrioxamine, or pyoverdine (20 µM each) as the sole source of iron (Figure 4). Supplementation of PDA medium with iron-saturated ferrichrome or ferrioxamine led to normal growth of all strains, indicating their direct assimilation by the fungus independently of siderophore production (Figures 4C, D). On the other hand, pyoverdine fully reversed the inhibitory effect of BPS on the WT and parent strains only, while the mutants exhibited growth directed towards the WT or their parent strains, which suggests siderophore spoliation (Figures 4E, F). To ensure that iron uptake by S. apiospermum from pyoverdine is mediated by its siderophore, the WT strain, the $\Delta ku70$ parent strain, and the mutants were cultivated separately. In these experiments, pyoverdine supported the growth of the WT and parent strains only (Figures 4G, H), confirming that N^{α} -methylcoprogen B is essential for iron acquisition from pyoverdine in S. apiospermum.





Frontiers in Cellular and Infection Microbiology | www.frontiersin.org

7

October 2020 | Volume 10 | Article 587909

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez Scedosporium apiospermum, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose 2000 143

sidD Deficiency Attenuates the Virulence of S. apiospermum in a Neutropenic Murine Model of Disseminated Scedosporiosis

To determine whether *sidD* plays a role in fungal pathogenesis, we compared the WT strain, the $\Delta ku70$ parent strain, and the AsidD mutants regarding their virulence in a neutropenic mouse model of disseminated scedosporiosis. In a preliminary study, four different inocula of S. apiospermum WT strain IHEM 14462 were assayed $(2 \times 10^2, 2 \times 10^3, 2 \times 10^4, \text{ or } 2 \times 10^5 \text{ CFU/animal})$ to establish the inoculum that can cause acute infection. In the inoculum escalation study no animal infected with the higher inocula, i.e., 2×10^5 or 2×10^4 CFU/animal; survived to the infection with a mean survival time (MST) of 3 and 4 days, respectively. All animals except one (20%) challenged with 2 \times 10^3 CFU succumbed to the infection (MST = 6), while only 40% of animals receiving 2 \times 10² CFU died (data not shown). Therefore, the 2 \times 10³ CFU inoculum load was used for challenging immunosuppressed mice with the different strains included in this study. In the virulence comparison study, infection by WT strain caused a slightly higher mortality (MST = 5 days with all mice dying 7 days post-infection) thanobserved in the inoculum-size study (P = 0.35). A significant difference in survival was seen between mice infected with the WT strain and those challenged with the $\Delta ku70$ mutant (P = 0.006) (Figure 5A). Nevertheless, disruption of sidD gene resulted in a marked reduction in virulence. Animals challenged with the ΔsiD mutants survived significantly longer than those infected with the WT strain (P < 0.0001) or with their $\Delta ku70$ parent strain ($P \leq 0.001$). All animals infected with the AsiD mutants (isolates M2 and M3), except one infected with isolate M1, survived to the experiment.

Due to the high mortality reached, only one animal from the WT group was used for CFU determination on day 6. In consequence data from two animals euthanatized 5 days post-infection were included (**Figure 5B**). No CFU were recovered from organs of animals infected with ΔsiD mutants, while animals inoculated with the WT or $\Delta ku70$ strains showed high fungal load in kidneys (log₁₀ mean ± SD, 4.69 ± 0.11 and 4.55 ± 0.17 CFUs/g, respectively). No colonies were recovered from brain or lungs. At the end of the experimental time (day 20 post-infection), no fungal elements were isolated from any organs of ΔsiD -infected animals (data not shown).

DISCUSSION

Genome inspection of S. apiospermum strain IHEM 14462 previously evidenced several genes putatively involved in siderophore biosynthesis (Le Govic et al., 2018), notably an ortholog of sidD, which encodes an NRPS that is known to drive the synthesis of the hydroxamate-type siderophore fusarinine C in A. fumigatus (Schrettl et al., 2007). Like other siderophore-producing fungi, notably Aspergillus spp., the S. apiospermum sidD gene is clustered with five other genes implicated in siderophore biosynthesis (sidI, sidF, and sidL orthologs) and transport (one sitT and one mir orthologs) (Le Govic et al., 2018). Additionally, the transcriptomic analysis supported the role of S. apiospermum sidD gene in iron metabolism, since it was induced during iron starvation and conversely repressed in iron-repleted conditions (Le Govic et al., 2018). However, although the structural organization of S. apiospermum SidD resembles that of Aspergillus species, none of the bioinformatics tools were able to predict the exact nature of the compound produced (Le Govic et al., 2019). Our first aim was to investigate the possible role of S. apiospermum sidD in the production of a secreted siderophore and, if applicable, to determine the exact nature of the compound synthesized.

Previously, Pateau et al. (2018) prepared from *S. aurantiacum* defective strains for a cytosolic Cu, Zn-superoxide dismutase



Frontiers in Cellular and Infection Microbiology | www.frontiersin.org

(SODC) and showed a surprisingly high frequency of homologous recombination of 30%. Other results from our laboratory suggested a markedly lower frequency in S. apiospermum, similar to those reported in the literature for other filamentous fungi (i.e., <3%) (Meyer, 2008). All our attempts to obtain defective strains for sidD gene in the wildtype background failed, resulting exclusively in ectopic recombination events. Thus, we first focused our attention on the generation of a strain deficient for the NHEJ system by deletion of the KU70 gene. This strategy is the gold standard to increase the frequency of homologous recombination in filamentous fungi (Krappmann, 2007) and was necessary to obtain a $\Delta sidD$ mutant in S. apiospermum. In our study, we have been limited by the genetic tools available for S. apiospermum and particularly by the limited number of resistance markers that can be applied to Scedosporium species. Indeed, these fungi are resistant to many antifungals. Currently, only two drugs are effective, phleomycin, which was used for engineering of the $\Delta ku70$ strain, and hygromycin B, which was used for selection of the defective strain $\Delta ku70/\Delta sidD$. Complementation was not possible since no other selection markers were available. Further genetic tools should be developed to allow the production of multiple mutants and complementation in Scedosporium species.

Mass spectrometry analysis performed on culture filtrates from the WT strain yielded two specific signature ions, corresponding to N^{α} -methylcoprogen B in its ferri- and desferri- forms, respectively. N^{α} -methylcoprogen B is a linear, hexadentate, hydroxamate-type siderophore. This compound was absent in the three $\Delta sidD$ mutants studied, demonstrating that sidD gene is required for its synthesis. Other siderophores like fusarinines or ferrichromes were not found in any sample. Besides N^{α} -methylcoprogen B, Bertrand et al. (2009) found that S. apiospermum also produces a dihydroxamate compound called dimerumic acid. Still, its involvement in iron homeostasis is controversial since it is both described as a degradation product of coprogen and as a natural product in other molds (Donzelli and Krasnoff, 2016). Moreover, the production of dimerumic acid in S. apiospermum may be strain-dependent since it was not detected in 8 out of 10 strains tested (including strain IHEM 14462), whereas N^{α} methylcoprogen B was found in the culture supernatant for all the strains studied (Bertrand et al., 2009). Interestingly, the in vivo production of N^{α} -methylcoprogen B was evidenced from sputum samples of CF patients colonized by a Scedosporium species (Bertrand et al., 2010). Besides, Scedosporium spp. were found to be the greatest siderophore producers in vitro compared with other CF fungal colonizers like Aspergillus species and Exophiala dermatitidis (Bertrand et al., 2010).

Siderophore-assisted acquisition of iron seems mandatory for *Scedosporium* survival, since the disruption of *sidD* resulted in the total lack of growth under iron-restricted conditions. At the same time, the incorporation of lyophilized filtrates from WT strain (thus containing N^{α} -methylcoprogen B) within the culture medium restored the phenotype. The lack of growth of the double mutants also highlights the almost absence of

Extracellular Siderophore Production in Scedosporium apiospermum

compensatory mechanisms for extracellular siderophore deficiency or at least the suboptimal role of RIA when the fungus is cultivated under iron-restricted conditions. Indeed, we previously showed that S. apiospermum possesses three RIA related genes which are overexpressed during iron carency, but their implication in fungal adaptation seems marginal in these conditions. Nonetheless, the RIA system might explain the WTlike growth of the sidD mutants when iron is not limiting. In addition to self-produced N^{α} -methylcoprogen B, S. apiospermum is able to appropriate iron through the acquisition of siderophore produced by other microorganisms (xenosiderophores), underlining its capacity for adaptation to changing environments and enhanced niche colonization. Our experiments revealed different patterns in xenosiderophore utilization by S. apiospermum, i.e., a direct acquisition from the hydroxamate-type siderophores ferrioxamine and ferrichrome, which probably utilizes the same membrane transporters, and an indirect acquisition from the mixed catechol-hydroxamate siderophore pyoverdine, which necessitates the presence of N^{α} methylcoprogen B. From a pathophysiological point of view, the latter observation might explain why prior colonization of the CF airways by Scedosporium species prevents the establishment of P. aeruginosa (Blyth et al., 2010). Other recent in vitro experiments found that co-cultures of S. aurantiacum and P. aeruginosa resulted in inhibition of scedosporial growth, raising the hypothesis of a siderophore-driven competition between the microorganisms for extracellular iron (Kaur et al., 2015; Chen et al., 2018; Homa et al., 2019). Nonetheless, this bacterial-fungal antagonism was not confirmed by Schwarz et al. (2017). These authors reported an increased rate of co-colonization with the mucoid phenotype of P. aeruginosa in Scedosporium-colonized CF patients. Interestingly, Sass et al. (2018) recently showed that P. aeruginosa was able to inhibit the growth of A. fumigatus through pyoverdine-mediated iron deprivation, since A. fumigatus is unable to utilize pyoverdine and, conversely, siderophore production by A. fumigatus was found to protect against the pyoverdine-mediated inhibition (Sass et al., 2019). Further epidemiological investigations, along with metabolomics studies of the lung microbiome, would help to understand better the bacterial-fungal interactions that occur within the CF bronchial mucus.

Our experiments showed that the abrogation of extracellular siderophore biosynthesis following inactivation of the NRPS SidD significantly decreased virulence of *S. apiospermum* in an immunocompromised murine model of disseminated scedosporiosis. Similarly, the deficiency of SidD/NPS6 orthologs caused a dramatic reduction of virulence in *A. fumigatus, Fusarium graminearum, Bipolaris maydis* (formerly *Cochliobolus heterostrophus*), *Bipolaris oryzae* (formerly *Cochliobolus miyabeanus*), and *Alternaria brassicicola*, demonstrating that siderophores are conserved virulence determinants of human, animal, and plant fungal pathogens (Oide et al., 2006; Schrettl et al., 2007). Likewise, Schrettl and coworkers (Schrettl et al., 2007) showed complementary, but different roles for extra- and intracellular siderophores during *A. fumigatus* infection, supporting extracellular siderophore

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology | www.frontiersin.org

October 2020 | Volume 10 | Article 587909

production as a therapeutic target. However, the contribution of individual iron metabolism-regulating mechanisms in virulence dramatically varies according to a pathogen. For instance, the siderophores synthesized by the phytopathogenic basidiomycetes *Ustilago maydis* and *Microbotryum violaceum* are dispensable for virulence (Mei et al., 1993; Birch and Ruddat, 2005), while some animal pathogenic ascomycetes (e.g., *Candida albicans*) and basidiomycetes (e.g., *Cryptococcus neoformans*) do not produce siderophores. Moreover, it has been demonstrated that in *U. maydis* and *C. albicans*, RIA (but not siderophores) was crucial for virulence (Ramanan and Wang, 2000; Eichhorn et al., 2006).

Of note, the $\Delta ku70$ parent strain was associated with a slightly lower virulence compared with the WT strain. However, both strains were phenotypically undistinguishable in terms of growth rate and ability to exploit iron from various sources. These observations are in line with other studies in which the NHEJ pathway in several filamentous models was inactivated through the deletion of the ku70 gene (Ninomiya et al., 2004; Nayak et al., 2006; Choquer et al., 2008; Hoff et al., 2010; Li et al., 2010; Qi et al., 2015; Gandía et al., 2016). The resulting $\Delta ku70$ strains were not reported to exhibit noticeable phenotypic differences with the WT strains, and they were further used as parent strains to delete genes of interest. Considering the lack of changes in growth features following deletion of the ku70 gene, the slight difference observed in our experiments in virulence among the WT and $\Delta ku70$ parent strains is probably due to some other disturbances in the mutated strain.

The main limitation of our study was the inability to assess the role of siderophore production in the development of a pulmonary infection. Indeed, regular route of Scedosporium acquisition is through inhalation, being the infection located primarily in the lungs. In an immunocompromised host, the disease may disseminate through the bloodstream, affecting multiple organs including the central nervous system. Likewise, in patients with CF, Scedosporium species are among the most common filamentous fungi colonizing the airways, where they are mainly regarded as « by-standers »; however, this colonization of the airways may be the cause of an invasive pulmonary infection with subsequent hematogenous dissemination of the fungus in case of lung or heart/lung transplantation. Such invasive conditions are associated with a high letality rate despite treatment, which is predominantly due to the lack of effective antifungal therapy. Therefore, our main objective here was to assess the importance of siderophore production in Scedosporium invasiveness in order to demonstrate its potential as new fungal-specific drug target. Hence we used the gold standard model for such purpose. The fact that the AsidD mutants were unable to cause a disseminated infection demonstrates that SidD is essential for virulence when S. apiospermum spreads through the bloodstream; however, this does not mean it will be essential in other tissues-e.g., in the airways. This could explain the conflicting results reported for the interactions with P. aeruginosa. Unfortunately, there is currently no validated animal model to evaluate the virulence of Scedosporium species after nasal or tracheal inoculation of spores, nor their ability to colonize the airways in

Extracellular Siderophore Production in Scedosporium apiospermum

immunocompetent mice, especially in CFTR deficient immunocompetent mice. Nevertheless, as already mentioned, N^{α} -methylcoprogen B was detected from almost all sputum samples analyzed by Bertrand et al. (2010) from CF patients colonized by *Scedosporium* species.

Altogether, our results revealed that the *S. apiospermum sidD* gene drives the synthesis of a unique extracellular siderophore, N^{α} -methylcoprogen B, that was found to be essential for fungal growth and virulence. This compound seems important for iron acquisition from pyoverdine, which might explain the apparent antagonism between *S. apiospermum* and *P. aeruginosa* within the CF lung. Further studies including evaluation of cultural characteristics and virulence of *sidC* (intracellular siderophore NRPS gene) disruptants in murine models of pulmonary or disseminated scedosporiosis are also needed to delineate the respective roles of intra- and extracellular siderophores in pathogenicity and protection of the fungus against the host immune defenses. Likewise, this study opens the way for investigating other genes encoding putative virulence factors in *Scedosporium* spp.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

All datasets presented in this study are included in the article/ Supplementary Material.

ETHICS STATEMENT

The animal study was reviewed and approved by Universitat Rovira i Virgili Animal Welfare and Ethics Committee (protocol number 8248).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

YL, J-PB, and PV conceived and designed the study. YL and PV performed genetic engineering, cultural studies, and siderophore production experiments. DL collected mass spectrometry data. VH performed mass spectrometry data curation, formal analysis, review, and editing. JC and DD performed virulence assays and corresponding analysis. YL wrote the first draft of the manuscript. NP and SL contributed to the discussion and correction of the manuscript. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This research was funded by the French patient organization against cystic fibrosis Anjou Muco (functional genomic studies; J-PB) and the Czech Science Foundation, grant number 19-10907S (chemical studies; VH).

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology | www.frontiersin.org

Extracellular Siderophore Production in Scedosporium apiospermum

ACKNOWLEDGMENTS

The content of this manuscript has been presented in part during the 9th Congress Trends in Medical Mycology (TIMM-9) that was held in Nice (France) on October 11–14, 2019 [abstract published in J Fungi (Basel) 2019, 5, 95; (Gangneux et al., 2019)].

REFERENCES

- Antelo, L., Hof, C., Welzel, K., Eisfeld, K., Sterner, O., and Anke, H. (2006). Siderophores produced by *Magnaporthe grisea* in the presence and absence of iron. Z. Naturforschung C J. Biosci. 61, 461–464. doi: 10.1515/znc-2006-5-626
- Bertrand, S., Larcher, G., Landreau, A., Richomme, P., Duval, O., and Bouchara, J.-P. (2009). Hydroxamate siderophores of *Scedosporium apiospermum*. *Biometals* 22, 1019–1029. doi: 10.1007/s10534-009-9253-0
- Bertrand, S., Bouchara, J.-P., Venier, M.-C., Richomme, P., Duval, O., and Larcher, G. (2010). N(α)-methyl coprogen B, a potential marker of the airway colonization by *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. *Med. Mycol.* 48(Suppl 1), S98–S107. doi: 10.3109/13693786.2010.503972
- Birch, L. E., and Ruddat, M. (2005). Siderophore accumulation and phytopathogenicity in *Microbotryum violaceum*. Fungal Genet. Biol. 42, 579– 589. doi: 10.1016/j.fgb.2004.11.001
- Blyth, C. C., Middleton, P. G., Harun, A., Sorrell, T. C., Meyer, W., and Chen, S. C.-A. (2010). Clinical associations and prevalence of *Scedosporium* spp. in Australian cystic fibrosis patients: identification of novel risk factors? *Med. Mycol.* 48(Suppl 1), S37–S44. doi: 10.3109/13693786.2010.500627
- Caza, M., and Kronstad, J. W. (2013). Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 3:80 doi: 10.3389/fcimb.2013.00080
- Chen, S. C.-A., Patel, S., Meyer, W., Chapman, B., Yu, H., Byth, K., et al. (2018). *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Scedosporium* and *Lomentospora* in vitro. *Mycopathologia* 183, 251–261. doi: 10.1007/s11046-017-0140-x
- Choquer, M., Robin, G., Le Pêcheur, P., Giraud, C., Levis, C., and Viaud, M. (2008). Ku70 or Ku80 deficiencies in the fungus *Botrytis cinerea* facilitate targeting of genes that are hard to knock out in a wild-type context. *FEMS Microbiol. Lett.* 289, 225–232. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01388.x
- Donzelli, B. G. G., and Krasnoff, S. B. (2016). "Chapter Ten Molecular Genetics of Secondary Chemistry in Metarhizium Fungi," in Advances in Genetics Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi. Eds. B Lovett and R. J. St. Leger (Cambridge, MA: Academic Press), 365-436. doi: 10.1016/ bs.adgen.2016.01.005
- Eichhorn, H., Lessing, F., Winterberg, B., Schirawski, J., Kämper, J., Müller, P., et al. (2006). A ferroxidation/permeation iron uptake system is required for virulence in Ustilago maydis. Plant Cell 18, 3332–3345. doi: 10.1105/ tpc.106.043588
- Gandía, M., Xu, S., Font, C., and Marcos, J. F. (2016). Disruption of ku70 involved in non-homologous end-joining facilitates homologous recombination but increases temperature sensitivity in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. *Fungal Biol*. 120, 317–323. doi: 10.1016/j.funbio.2015.11.001
- Gangneux, J.-P., Lortholary, O., Cornely, O. A., and Pagano, L. (2019). 9th Trends in Medical Mycology held on 11–14 October 2019, Nice, France, organized under the auspices of EORTC-IDG and ECMM. J. Fungi 5, 95. doi: 10.3390/ jof5040095
- Haas, H. (2014). Fungal siderophore metabolism with a focus on Aspergillus fumigatus. Nat. Prod. Rep. 31, 1266–1276. doi: 10.1039/c4np00071d
- Hissen, A. H. T., Chow, J. M. T., Pinto, L. J., and Moore, M. M. (2004). Survival of *Aspergillus fumigatus* in serum involves removal of iron from transferrin: the role of siderophores. *Infect. Immun.* 72, 1402–1408. doi: 10.1128/iai.72.3.1402-1408.2004
- Hoff, B., Kamerewerd, J., Sigl, C., Zadra, I., and Kück, U. (2010). Homologous recombination in the antibiotic producer *Penicillium chrysogenum*: strain DeltaPcku70 shows up-regulation of genes from the HOG pathway. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 85, 1081–1094. doi: 10.1007/s00253-009-2168-4

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2020. 587909/full#supplementary-material

SUPPLEMENTARY VIDEO 1 | CycloBranch real time performance indicating the dereplication process in *Scedosporium* extract

- Homa, M., Sándor, A., Tóth, E., Szebenyi, C., Nagy, G., Vágvölgyi, C., et al. (2019). In vitro interactions of *Pseudomonas aeruginosa* with *Scedosporium* species frequently associated with cystic fibrosis. *Front. Microbiol.* 10, 441. doi: 10.3389/fmicb.2019.00441
- Kaur, J., Pethani, B. P., Kumar, S., Kim, M., Sunna, A., Kautto, L., et al. (2015). *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Scedosporium aurantiacum*, an opportunistic fungal pathogen isolated from the lungs of cystic fibrosis patients. *Front. Microbiol.* 6:866. doi: 10.3389/fmicb.2015.00866
- Krappmann, S. (2007). Gene targeting in filamentous fungi: the benefits of impaired repair. Fungal Biol. Rev. 21, 25–29. doi: 10.1016/j.fbr.2007.02.004
- Le Govic, Y., Papon, N., Le Gal, S., Lelièvre, B., Bouchara, J.-P., and Vandeputte, P. (2018). Genomic organization and expression of iron metabolism genes in the emerging pathogenic mold *Scedosporium apiospermum. Front. Microbiol.* 9, 827. doi: 10.3389/fmicb.2018.00827
- Le Govic, Y., Papon, N., Le Gal, S., Bouchara, J.-P., and Vandeputte, P. (2019). Nonribosomal peptide synthetase gene clusters in the human pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum. Front. Microbiol.* 10, 2062. doi: 10.3389/fmicb. 2019.02062
- Li, Z.-H., Du, C.-M., Zhong, Y.-H., and Wang, T.-H. (2010). Development of a highly efficient gene targeting system allowing rapid genetic manipulations in *Penicillium decumbens. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 87, 1065–1076. doi: 10.1007/s00253-010-2566-7
- Liu, Z., and Friesen, T. L. (2012). Polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation in filamentous fungal pathogens. *Methods Mol. Biol.* 835, 365–375. doi: 10.1007/978-1-61779-501-5_21
- Mei, B., Budde, A. D., and Leong, S. A. (1993). *sid1*, a gene initiating siderophore biosynthesis in *Ustilago maydis*: molecular characterization, regulation by iron, and role in phytopathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 903–907. doi: 10.1073/pnas.90.3.903
- Meyer, V. (2008). Genetic engineering of filamentous fungi–progress, obstacles and future trends. *Biotechnol. Adv.* 26, 177–185. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.12.001
- Nayak, T., Szewczyk, E., Oakley, C. E., Osmani, A., Ukil, L., Murray, S. L., et al. (2006). A versatile and efficient gene-targeting system for Aspergillus nidulans. Genetics 172, 1557–1566. doi: 10.1534/genetics.105.052563
- Ninomiya, Y., Suzuki, K., Ishii, C., and Inoue, H. (2004). Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12248–12253. doi: 10.1073/pnas.0402780101
- Novák, J., Škríba, A., and Havlíček, V. (2020). CycloBranch 2: molecular formula annotations applied to imzML data sets in bimodal fusion and LC-MS data files. Anal. Chem. 92, 6844–6849. doi: 10.1021/acs.analchem.0c00170
- Oide, S., Moeder, W., Krasnoff, S., Gibson, D., Haas, H., Yoshioka, K., et al. (2006). NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophoremediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. *Plant Cell* 18, 2836–2853. doi: 10.1105/tpc.106.045633
- Pateau, V., Razafimandimby, B., Vandeputte, P., Thornton, C. R., Guillemette, T., Bouchara, J.-P., et al. (2018). Gene disruption in *Scedosporium aurantiacum*: proof of concept with the disruption of *SODC* gene encoding a cytosolic Cu,Zn-superoxide dismutase. *Mycopathologia* 183, 241–249. doi: 10.1007/s11046-017-0204-y
- Pluháček, T., Lemr, K., Ghosh, D., Milde, D., Novák, J., and Havlíček, V. (2016). Characterization of microbial siderophores by mass spectrometry. *Mass Spectrom. Rev.* 35, 35–47. doi: 10.1002/mas.21461
- Qi, X., Su, X., Guo, H., Qi, J., and Cheng, H. (2015). A ku70 null mutant improves gene targeting frequency in the fungal pathogen Verticillium dahliae. World J. Microbiol. Biotechnol. 31, 1889–1897. doi: 10.1007/s11274-015-1907-1
- Ramanan, N., and Wang, Y. (2000). A high-affinity iron permease essential for Candida albicans virulence. Science 288, 1062–1064. doi: 10.1126/ science.288.5468.1062

Frontiers in Cellular and Infection Microbiology | www.frontiersin.org

October 2020 | Volume 10 | Article 587909

Extracellular Siderophore Production in Scedosporium apiospermum

- Ramirez-Garcia, A., Pellon, A., Rementeria, A., Buldain, I., Barreto-Bergter, E., Rollin-Pinheiro, R., et al. (2018). *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists. *Med. Mycol.* 56, 102–125. doi: 10.1093/ mmy/myx113
- Sass, G., Nazik, H., Penner, J., Shah, H., Ansari, S. R., Clemons, K. V., et al. (2018). Studies of *Pseudomonas aeruginosa* mutants indicate pyoverdine as the central factor in inhibition of *Aspergillus fumigatus* biofilm. *J. Bacteriol.* 200 (1), e00345-17. doi: 10.1128/JB.00345-17
- Sass, G., Ansari, S. R., Dietl, A.-M., Déziel, E., Haas, H., and Stevens, D. A. (2019). Intermicrobial interaction: Aspergillus fumigatus siderophores protect against competition by *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* 14, e0216085. doi: 10.1371/journal.pone.0216085
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Joechl, C., Rogers, T., Arst, H. N., et al. (2004). Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. J. Exp. Med. 200, 1213–1219. doi: 10.1084/ jem.20041242
- Schrettl, M., Bignell, E., Kragl, C., Sabiha, Y., Loss, O., Eisendle, M., et al. (2007). Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. *PLoS Pathog.* 3, 1195–1207. doi: 10.1371/journal.ppat.0030128
- Schwarz, C., Brandt, C., Antweiler, E., Krannich, A., Staab, D., Schmitt-Grohé, S., et al. (2017). Prospective multicenter German study on pulmonary colonization with *Scedosporium /Lomentospora* species in cystic fibrosis: epidemiology and new association factors. *PLoS One* 12, e0171485. doi: 10.1371/journal.pone.0171485

- Turgeon, B. G., Condon, B., Liu, J., and Zhang, N. (2010). Protoplast transformation of filamentous fungi. *Methods Mol. Biol.* 638, 3-19. doi: 10.1007/978-1-60761-611-5_1
- Waldron, K. J., and Robinson, N. J. (2009). How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal? *Nat. Rev. Microbiol.* 7, 25–35. doi: 10.1038/nrmicro2057
- Winkelmann, G. (2007). Ecology of siderophores with special reference to the fungi. *Biometals* 20, 379–392. doi: 10.1007/s10534-006-9076-1
- Yasmin, S., Alcazar-Fuoli, L., Gründlinger, M., Puempel, T., Cairns, T., Blatzer, M., et al. (2012). Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen Aspergillus fumigatus. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109, E497–E504. doi: 10.1073/pnas.1106399108

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Le Govic, Havliček, Capilla, Luptáková, Dumas, Papon, Le Gal, Bouchara and Vandeputte. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms. **Discussion et perspectives**

La mucoviscidose est une des maladies génétiques potentiellement graves les plus fréquentes en France et dans les pays occidentaux. Bien que tous les organes dotés d'un tissu épithélial soient touchés, le pronostic est essentiellement lié à l'atteinte de l'appareil respiratoire. Les modifications biochimiques et rhéologiques du mucus bronchique altèrent le bon fonctionnement du tapis muco-ciliaire, et créent un environnement particulièrement propice au développement des microorganismes inhalés. Les bactéries figurent au premier rang parmi les agents responsables d'infections respiratoires chez les patients mucoviscidosiques. Les progrès considérables réalisés en matière de prévention et de prise en charge thérapeutique des infections bactériennes, joints à l'amélioration du statut nutritionnel des patients et à la mise en place d'un dépistage précoce de la maladie, se sont malheureusement accompagnés d'une augmentation de l'incidence des infections dues aux micromycètes. Aujourd'hui, les espèces du genre *Scedosporium* se classent au deuxième rang des champignons filamenteux responsables d'infection respiratoire et/ou de colonisation des voies aériennes chez les patients de mucoviscidose, derrière *Aspergillus fumigatus* [2].

Les travaux de révision taxonomique du genre *Scedosporium* entamés en 2005 par Gilgado *et al.* [357–359], complétés très récemment par une étude de phylogénie moléculaire extrêmement précise [150], permettent de dénombrer aujourd'hui 10 espèces au sein du genre *Scedosporium*, dont 5 forment le complexe *S. apiospermum* (*S. boydii, S. ellipsoideum, S. apiospermum sensu stricto, S. angustum* et *S. fusoideum*), auxquelles il faut adjoindre deux autres espèces potentiellement pathogènes dans un contexte de mucoviscidose, *S. aurantiacum* et *S. minutisporum*. Bien que phylogénétiquement proches, les espèces du genre *Scedosporium* présentent des niveaux de virulence ainsi que de profils de sensibilité aux antifongiques distincts [149,358–361]. Selon une étude s'intéressant à *S. aurantiacum*, il semblerait même que la virulence soit souche dépendante [362]. Pourtant, il existe relativement peu de données sur les facteurs de pathogénicité impliqués dans l'établissement et le maintien d'une infection par les *Scedosporium* chez l'hôte mammifère.

Au cours des dernières années, le Groupe d'Etude des Interactions Hôte-Pathogène s'est attaché à clarifier la biologie des différentes espèces du genre *Scedosporium* ainsi que leurs mécanismes pathogéniques. Grâce au séquençage complet du génome d'une souche clinique de *S. apiospermum* en 2014 [5], le GEIHP a pu rapidement entamer des travaux de génomique comparative et de transcriptomique afin d'identifier des gènes potentiellement impliqués dans la pathogénicité et l'adaptation aux conditions rencontrées au sein du poumon mucoviscidosique. Cette thèse s'inscrit dans la lignée des travaux visant à caractériser ces facteurs de pathogénicité.

Comme évoqué précédemment, la capacité des microorganismes à accéder aux ressources en fer constitue un facteur clé de leur virulence. Deux mécanismes majoritaires sont décrits chez les champignons filamenteux : la sécrétion de sidérophores et l'assimilation réductive du fer (RIA). Les données sur ce sujet étant très parcellaires pour les *Scedosporium*, nous nous sommes proposés d'étudier les mécanismes d'acquisition du fer chez la souche *S. apiospermum* IHEM 14462 dont le génome était disponible, en vue de décrypter leur rôle dans la pathogénicité, et ainsi identifier de nouvelles cibles thérapeutiques potentielles.

Chez les Ascomycètes, les sidérophores sont produits par synthèse peptidique non-ribosomale, qui s'effectue *via* des protéines appelées *non-ribosomal peptide synthetases* (NRPSs). Il a été montré antérieurement dans notre unité que, dans des conditions de carence en fer, *S. apiospermum* est capable de

produire un sidérophore, le N^{α} -méthylcoprogène B. Cependant, les gènes assurant la synthèse de cet hydroxamate restaient inconnus, et l'implication d'autres sidérophores dans le métabolisme du fer n'avait jamais été investiguée, notamment lorsque le champignon se développe dans un environnement riche en fer lié à des protéines comme c'est le cas chez l'hôte. Ainsi, une première partie de mon travail de thèse a consisté à réaliser une analyse in silico, fondée sur les homologies de séquence avec les protéines décrites dans la littérature comme impliquées dans le métabolisme du fer chez A. fumigatus. Cette étude de génomique comparative a permis de montrer que S. apiospermum possédait l'information génétique requise pour une acquisition efficace du fer [363]. Plus précisément, nous avons pu identifier 7 orthologues des gènes SID, dont 2 codent des NRPSs impliquées dans la synthèse de la fusarinine C (FsC, sidérophore extracellulaire) et de la ferricrocine (sidérophore intracellulaire) chez A. fumigatus. En revanche, l'inspection du génome de S. apiospermum n'a pas permis d'identifier d'orthologue pour sidG et estB, qui codent respectivement pour des enzymes de production et d'hydrolyse de la triacétylfusarinine C (TAFC), le dérivé triacétylé de la FsC. De façon intéressante, cette absence d'enzymes du métabolisme de la TAFC a été rapporté chez A. niger qui sécrète non pas de la TAFC, mais du coprogène B [270]. Outre les gènes de biosynthèse des sidérophores, cette analyse a révélé la présence d'un orthologue de sitT codant un transporteur ABC chargé de la sécrétion de l'aposidérophore (*i.e.* sidérophore ne contenant pas de fer), ainsi qu'un nombre important de gènes codant (i) des transporteurs membranaires de type MFS potentiellement impliqués dans l'assimilation des complexes ferrisidérophores (n = 8), ou encore (ii) des protéines transmembranaires de type réductase, ferroxydase ou perméase potentiellement impliquées dans la RIA (n = 13). Chez S. apiospermum, les gènes des sidérophores sont organisés en clusters, comme c'est le cas chez les autres champignons filamenteux. Néanmoins, la composition de ces clusters présente davantage de similitudes avec d'autres Sordariomycètes tels que Trichoderma reesei ou Colletotrichum higginsianum, qu'avec les Aspergillus (qui eux, appartiennent au clade des Eurotiomycètes) [363]. L'agencement des gènes de sidérophores est donc la résultante de l'évolution phylogénétique, sans présumer du caractère pathogène des champignons étudiés. Les gènes contrôlant les mécanismes d'assimilation réductive, quant à eux, sont dispersés dans le génome de S. apiospermum, hormis les couples SAPIO_CDS0314 /SAPIO_CDS0315 qui codent respectivement une ferroxydase de type FetC (Fet3p) et une perméase de type FtrA (Ftr1p) et SAPIO_CDS0321/SAPIO_CDS0322 qui codent eux aussi une perméase de type FtrA et une ferroxydase de type FetC. Dans chaque couple, les deux gènes sont contigus et inversés, ce qui est traditionnellement observé chez les champignons (aussi bien chez des Ascomycètes comme Aspergillus fumigatus [306], que chez les Basidiomycètes comme Laccaria bicolor [364] ou Pleurotus ostreatus [365]) et ces deux couples de gènes sont situés à proximité l'un de l'autre sur le contig 022.

Pour confirmer l'implication des gènes identifiés par cette analyse bioinformatique dans l'acquisition du fer extracellulaire, nous avons étudié leur niveau d'expression par RT-qPCR après culture dans des conditions de carence en fer ou au contraire, en présence d'un excès de fer. Comme nous l'espérions, l'expression des orthologues des gènes *SID* et de la majorité des gènes codant les transporteurs spécifiques, est induite lors d'une carence martiale [363]. A l'inverse, la plupart de ces gènes sont réprimés en présence d'un excès de fer, attestant ainsi de leur implication dans l'acquisition du fer médiée par les sidérophores. A noter que le gène *sidH* (codant la mévalonyl-CoA hydratase) est le seul gène de la famille *SID* qui reste surexprimé en condition d'excès de fer. Ce constat est probablement à mettre en lien avec l'activité de la protéine SidH, qui catalyse une

réaction réversible [366], permettant ainsi de freiner la voie des isoprénoïdes et donc la biosynthèse des sidérophores extracellulaires. Par ailleurs, la majorité (5/9) des gènes potentiellement impliqués dans le transport des sidérophores sont iso-exprimés en cas de carence martiale. Le plus surprenant est l'orthologue de mirB (CDS2804) localisé, comme chez A. fumigatus, dans le cluster de sidD. Il est établi que dans les conditions de carence martiale, l'expression de mirB est induite par le facteur de transcription HapX [252,308]. Ce dernier agit via son interaction avec le CCAAT-binding complex (CBC), lui-même chargé de reconnaître les motifs CCAAT dans les régions promotrices des gènes cibles [308,367]. L'analyse des promoteurs de tous les gènes 'SITs' induits lors d'une carence martiale chez S. apiospermum a révélé la présence de 3 à 5 motifs CCAAT, contre seulement un motif pour le locus SAPIO_CDS2804. Nous avons donc supposé que le niveau d'expression des gènes 'SITs' pouvait être relié au nombre de motifs CCAAT présents dans leur promoteur. Cette hypothèse a été réfutée par la suite, puisque nous avons décelé entre 2 et 5 motifs CCAAT au sein des régions promotrices des quatre autres orthologues 'SITs' insensibles à la déplétion en fer (CDS1833, 5249, 6391, and 9285). Il s'avère que deux de ces gènes (CDS1833 et 9285) appartiennent à des clusters contenant un gène NRPS non lié au métabolisme du fer (CDS1828 et 9291) ; ces deux gènes sont donc très vraisemblablement impliqués dans le transport du peptide correspondant [368]. L'absence d'induction des protéines codées par les loci CDS2804, 5249 et 6391 reste à explorer.

Malgré une apparente expansion des acteurs de la RIA chez S. apiospermum, en particulier les métalloréductases (n = 9), nos résultats expérimentaux confirment l'implication de seulement 3 des 13 gènes identifiés in silico. Ceci interpelle quant à la fonction des gènes dont l'expression reste inchangée. Pourtant, ces observations sont en accord avec les données de la littérature. La RIA est un système tripartite associant une réductase ferrique (métalloréductase) à un tandem ferroxydase/perméase. Le nombre de gènes putatifs de métalloréductases varie d'un organisme à l'autre, mais il est en général assez élevé : 8 chez Saccharomyces cerevisiae et Cryptococcus neoformans, 15 chez Aspergillus fumigatus, ou encore 17 chez Candida albicans [369]. Pourtant, seul un petit nombre d'entre eux codent pour des enzymes réellement impliquées dans la réduction du fer ferrique à la surface cellulaire : 1 chez A. fumigatus (freB) et C. neoformans (fre2), 2 chez C. albicans (fre7 et fre10). De façon intéressante, chez S. apiospermum, le seul locus répondant aux variations de concentration en fer (CDS2383) est celui qui présente le plus d'homologies avec la réductase FreB d'A. fumigatus. De manière identique, seul le tandem ferroxydase/réductase présentant le plus haut degré d'homologie avec la paire de gènes fetC/ftrA d'A. fumigatus (CDS0314/CDS0315) était significativement surexprimé lors d'une déplétion en fer. Il est important de rappeler que deux paires d'homologues de FetC/FtrA avec des fonctions bien distinctes sont décrits chez la levure S. cerevisiae, à savoir le complexe Fet3p/Ftr1p, qui prend en charge la canalisation des ions Fe^{3+} à travers la membrane plasmique de la levure (mécanisme RIA), tandis que le complexe paralogue Fet5p/Fth1p est responsable de la mobilisation des réserves intravacuolaires de fer [370]. Par conséquent, on peut émettre l'hypothèse que le couple ferroxidase/perméase iso-exprimé lors d'une carence martiale chez S. apiospermum (CDS0321/CDS0322) est impliqué dans le trafic vacuolaire de fer plutôt que dans la RIA. L'existence d'une homéostasie vacuolaire du fer chez S. apiospermum est corroborée par la surexpression, en milieu replété en fer, d'un orthologue de ccc1/cccA dont le rôle est de constituer un pool intravacuolaire de fer afin d'en limiter la toxicité [269,371].

Compte tenu de l'importance des NRPSs dans la physiologie et l'adaptation des champignons aux différents environnements, nous avons étendu l'inspection du génome de S. apiospermum à l'ensemble des NRPSs potentielles. Dans cette optique, nous avons interrogé la plateforme antiSMASH (version fongique), qui chez les organismes procaryotes, présente l'avantage de fournir des résultats très détaillés (i.e. détection des NRPSs et prédiction des monomères sélectionnés) directement à partir d'une séquence génomique. Nous avons ainsi pu détecter, en plus des 2 clusters de sidérophores, 7 clusters contenant un gène NRPS. Deux de ces clusters seraient impliqués dans la synthèse de composés de type épidithiodioxopipérazine (ETP), qui est une famille de métabolites secondaires hautement réactifs caractérisés par la présence d'un pont disulfure (S-S) intramoléculaire, support de leur activité. La toxicité des ETPs est en effet liée au cycle redox, permettant (i) la liaison aux résidus cystéines de certaines protéines via leurs groupements thiols libres (-SH) (forme réduite), obtenus par l'action d'un agent réducteur, et (ii) la production d'espèces radicalaires via la régénération du pont disulfure intramoléculaire au contact de l'oxygène (forme oxydée) [372]. L'ETP fongique le plus connu est la gliotoxine [373], qui est une mycotoxine abondamment produite par A. fumigatus dès son installation dans les voies respiratoires [374]. Ce facteur de virulence agirait comme un immunomodulateur, facilitant ainsi l'échappement à la réponse immune malgré les dommages causés au niveau de l'épithélium bronchique, et donc la propagation du pathogène [375]. De manière intéressante, la disruption de gliP (codant la NRPS gliotoxine) s'accompagne d'une diminution de la virulence d'A. fumigatus uniquement dans un modèle murin non-neutropénique, ce qui suggère un rôle important de la gliotoxine dans l'échappement du champignon à l'action lytique des PNN [374]. Aussi, la gliotoxine représente un facteur clé pour le maintien de la colonisation aspergillaire au sein du poumon mucoviscidosique, où la fonction des PNN est exacerbée [376]. De façon analogue, la production d'un composé « gliotoxine-like » pourrait contribuer à la persistance de S. apiospermum dans le poumon mucoviscidosique. Bien que l'une des NRPSs 'ETP' de S. apiospermum (SAPIO_CDS1828) partage 30% d'homologie de séquence avec la protéine GliP d'A. fumigatus, l'analyse fine du cluster correspondant, combinée aux prédictions du logiciel antiSMASH suggère que le locus CDS1828 est plutôt responsable de la production de dérivés de l'aranotine, les boydines dont 4 membres ont déjà été identifiés chez S. boydii [368]. Parmi ces dérivés qui à notre connaissance sont spécifiques des Scedosporium, la boydine B a montré une activité contre diverses bactéries anaérobies comme Bifidobacterium sp., Veillonella parvula, Anaerostreptococcus sp., Bacteroides vulgatus et Peptostreptococcus sp. [377], lesquelles occupent une place prépondérante dans le microbiote pulmonaire des patients mucoviscidosiques « stables » [90,98]. De la même manière, un certain nombre d'autres ETPs retrouvés chez S. boydii, notamment la gliotoxine et ses dérivés bisdéthiobis(méthylthio)gliotoxine et déhydroxybisdéthiobis(méthylthio)gliotoxine, possèdent une activité antibiotique vis-à-vis de S. aureus, y compris les souches méthicillino-résistantes [378]. Ainsi, les Scedosporium qui sont en compétition perpétuelle avec les autres pathogènes bactériens et fongiques pour l'accès aux nutriments ont dû développer différents mécanismes de protection, comprenant la sécrétion de métabolites secondaires à activité antimicrobienne. Le rôle de ces composés dans la défense des Scedosporium au sein du mucus bronchique devra être investiqué à l'avenir.

Outre les ETPs, nous avons tenté de déterminer la composition des peptides produits par deux autres clusters de NRPS. En effet, les loci SAPIO_CDS6317 et SAPIO_CDS10511 codent des NRPSs présentant des homologies de séquences avec les synthétases de l'enniatine et de la destruxine, qui sont des

hexadepsipeptides cycliques possédant une activité antibactérienne et antifongique [368]. Cependant, les analyses phylogénétiques conjuguées à l'introspection des clusters correspondants ne sont pas en faveur de la synthèse de ces composés par *S. apiospermum*. En particulier, l'absence d'orthologues des gènes *dtxS3* et *dtxS4*, qui assurent la production des deux premiers substrats nécessaires à la synthèse de la destruxine, réfute cette hypothèse. A noter qu'une série d'hexapeptides cycliques, dénommés pseudocyclines A à E, a toutefois été isolée dans des surnageants de culture de *S. boydii* [379]. Si le rôle de ces pseudacyclines n'est pas encore totalement élucidé (immunomodulateur ?), il est intéressant de noter que la plus abondante d'entre elles, la pseudacycline A, peut être détectée directement à la surface des spores, suggérant la possibilité d'utiliser cette molécule comme biomarqueur d'infection précoce par *Scedosporium*.

Bien que l'approche *in silico* nous ait permis d'apprécier le potentiel de synthèse NRPS chez *S. apiospermum*, les résultats se sont montrés décevants quant à la prédiction de la spécificité des domaines d'adénylation, empêchant ainsi toute spéculation sur la composition exacte du peptide produit. En conséquence, seule la production de mutants invalidés pour chacune de ces NRPSs permettrait de préciser la nature exacte du métabolite secondaire dont elles permettent la synthèse.

Néanmoins, les manipulations génétiques et la production de mutants chez *S. apiospermum* n'étaient qu'à leurs balbutiements au début de cette thèse. Aussi, la disruption de 9 gènes chez *S. apiospermum* constituait un projet audacieux compte tenu (i) des rares outils de transformation génétique disponibles, en particulier le nombre très limité de marqueurs de sélection applicables aux *Scedosporium*, (ii) de la complexité du protocole de transformation, qui implique notamment la génération de protoplastes à partir de tubes germinatifs, et surtout (iii) du faible taux de recombinaison homologue des cassettes de délétions apportées par transgenèse.

L'intégration d'un fragment d'ADN exogène dans un chromosome fait en effet appel à des mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN [380]. Deux voies de réparation majeures pour les cassures double brin ont été identifiées : la voie HR (homologous recombination), qui implique l'interaction de séquences homologues, et la voie NHEJ (non-homologous-end-joining), qualifiée d'illégitime puisqu'elle implique la religature directe des extrémités d'ADN brisées [381]. Ces deux voies sont considérées comme agissant de manière indépendante et compétitive [380,382]. Or, si la voie HR est celle principalement employée par la levure Saccharomyces cerevisiae [383], conduisant à un fort taux d'intégration au locus, et ce, même en utilisant de très courtes régions flanquantes (~ 100 pb), il n'en est pas de même chez les champignons filamenteux qui utilisent préférentiellement la voie NHEJ [384]. En conséquence, un fragment d'ADN exogène s'intègre rarement dans le génome receveur à un site homologue, même s'il porte de longues régions flanquantes (\geq 1 kb) [385]. Dans les cellules eucaryotes, la voie NHEJ nécessite la liaison du complexe hétérodimérique Ku70/Ku80 à des extrémités d'ADN cassées [386]. Afin d'augmenter la probabilité de recombinaison homologue (et donc, l'intégration au locus des cassettes apportées par transgénèse), plusieurs auteurs se sont attachés à produire des souches invalidées pour les gènes ku70 et/ou ku80. Cette stratégie a été couronnée de succès chez une multitude de champignons filamenteux, comme Neurospora crassa [387], Aspergillus spp. [388-391], Botrytis cinerea [392], Penicillium spp. [393-396], Colletotrichum higginsianum [397], ou encore Verticillium dahliae [398]. A titre d'exemple, il a été montré que, chez A. niger, la délétion d'un des deux membres du couple ku70/ku80 augmentait la fréquence de recombinaison homologue d'un facteur 18, passant ainsi de 3,6 à 65,6% [391]. L'invalidation du système NHEJ ne s'accompagnant pas de différences phénotypiques notables comparativement aux souches parentales (WT), ces souches mutées ont été utilisées comme nouvelles souches parentales pour des études de génomique fonctionnelle *via* la suppression de gènes d'intérêt. Dans ce contexte, nous avons dans un premier temps généré une souche mutée $\Delta ku70$ de *S. apiospermum* à partir de la souche sauvage IHEM 14462 [399]. Cette souche ayant permis la production du tout premier mutant de *S. apiospermum* dans notre laboratoire (mutant $\Delta cyr1$ délété pour l'adénylate cyclase, Dr P. Vandeputte), nous avons décidé de l'utiliser comme souche parentale pour tenter d'invalider les 9 gènes NRPS présents chez ce champignon.

Malheureusement, malgré l'invalidation du gène ku70, nous avons été confrontés à de nombreuses difficultés. En effet, plusieurs de nos tentatives ont abouti à la production de transformants (vérifiés par PCR), mais la grande majorité d'entre eux étaient en fait des mutants « ectopiques », *i.e.* ayant intégré la cassette de délétion au niveau d'un site non désiré tout en conservant le gène que nous souhaitions invalider. Chez *S. apiospermum*, la délétion du gène ku70 ne permet donc pas à elle seule d'obtenir un taux de recombinaison homologue satisfaisant. Certains auteurs rapportent un taux de recombinaison homologue accru chez les doubles mutants $\Delta ku70/\Delta ku80$ par rapport aux souches mono-délétées $\Delta ku70$ ou $\Delta ku80$ [388,391]. Cette solution n'était pas envisageable chez *S. apiospermum* en raison du nombre limité de marqueurs de résistance (seules la phléomycine et l'hygromycine peuvent être utilisées chez *S. apiospermum*), et de l'utilisation de l'un d'entre eux pour maintenir la pression de sélection sur la souche $\Delta ku70$. Par ailleurs, il a été rapporté que la délétion combinée de ku70 et ku80 s'accompagne parfois d'une instabilité génomique et d'une modification de certains caractères phénotypiques (croissance, conidiogénèse, thermotolérance...) comparé aux souches parentales, ce qui aurait limité l'interprétation des résultats [391,400].

Toutefois, l'utilisation de cette souche $\Delta ku70$ nous a permis de générer des mutants pour l'orthologue du gène sidD qui code une enzyme jouant un rôle clé dans la biosynthèse de la fusarinine C chez Aspergillus fumigatus. La production de ces mutants a constitué une étape importante dans ma thèse puisque ces mutants ont permis la caractérisation fonctionnelle du gène sidD chez S. apiospermum. En effet, la comparaison des souches IHEM 14462 (WT), $\Delta ku70$, et $\Delta ku70/\Delta sidD$ montre que le gène sidD est bien responsable de la biosynthèse du N^{α} -méthylcoprogène B – sidérophore détecté au cours de travaux réalisés précédemment dans notre unité [347] – puisque la disruption de sidD entraîne l'abrogation de la synthèse de ce sidérophore. Les coprogènes sont des dimères ou des trimères de N^5 -acyl- N^5 -hydroxy-L-ornithine, dont 2 sont liés tête bèche pour former un noyau dicétopipérazine [228], le 3^{ème} motif (optionnel) étant lié au cyclodimère par une réaction d'estérification (alors que la fusarinine C résulte de l'estérification des trois motifs N⁵-acyl-N⁵-hydroxy-Lornithine avec cyclisation finale) (Figure 31). Plusieurs coprogènes ont été identifiés chez les champignons et leur diversité est principalement due à des différences dans les groupements acyle activés par la NRPS correspondante. Le coprogène B et/ou ses dérivés N-méthylés sont sécrétés par plusieurs organismes fongiques tels que Magnaporthe grisea [401], Histoplasma capsulatum [402], Acremonium chrysogenum [403], Fusarium dimerum [404], et Aspergillus niger [270]. La composition du cluster sidD chez A. niger montre d'ailleurs de curieuses similitudes avec S. apiospermum, puisque comme chez S. apiospermum, ce cluster ne comporte pas d'orthologues des gènes sidG (acétylation de la fusarinine C conduisant à la triacétylfusarinine C ou TAFC), estB (hydrolyse de la TAFC) et sidJ (hydrolyse de la fusarinine C) et présente un caractère monobloc ; or de façon

intéressante, *A. niger* est la seule espèce du genre *Aspergillus* capable de produire un dérivé du coprogène. Pourtant, la protéine qui partage le plus d'homologies avec la NRPS SidD d'*A. niger* (66%) est la protéine SidD d'*A. fumigatus*, responsable de la synthèse de fusarinine C [270], tandis que le deuxième plus haut score obtenu en blastP (65%) correspond à une synthétase de *Penicillium chrysogenum*, qui produit du coprogène [302]. Ces résultats montrent eux-aussi les limites des prédictions *in silico* pour les NRPs fongiques.

Dans notre première étude sur le métabolisme du fer chez *S. apiospermum* [363], nous avons remarqué que les gènes des sidérophores étaient beaucoup plus fortement surexprimés que les gènes de la RIA lorsque le champignon était cultivé en condition de carence martiale. Ces résultats suggèrent que le système sidérophore est prépondérant dans l'adaptation du champignon lorsque le fer se fait plus rare. Le phénotype des mutants $\Delta sidD$ conforte cette hypothèse, puisque ceux-ci sont incapables de pousser sur un milieu contenant un chélateur de fer (BPS). En revanche, la RIA pourrait expliquer pourquoi les mutants $\Delta sidD$ présentent une croissance identique aux souches WT et $\Delta ku70$ lorsque le fer est présent en quantité suffisante.

La plupart des champignons microscopiques sont capables de s'approprier le fer lié à des sidérophores sécrétés par d'autres microorganismes (bactériens et/ou fongiques). Ce « piratage » des xénosidérophores est particulièrement bien décrit chez les levures, qui ne produisent pas de sidérophores, mais expriment à leur surface une multitude de transporteurs SITs spécialisés dans l'internalisation de complexes ferri-sidérophores. Les champignons filamenteux, quant à eux, semblent utiliser non seulement les transporteurs SITs mais également leurs apo-sidérophores dont l'affinité pour le fer pourrait perturber l'équilibre préalablement établi entre les ions Fe³⁺ et des xénosidérophores. A noter que chez les Mucorales, l'acquisition du fer à partir de ferrioxamine - forme ferrisée de la desferrioxamine, un médicament utilisé dans le traitement des surcharges en fer – fait appel au mécanisme d'assimilation réductive, et non pas au système sidérophore [405]. Ainsi, nous avons cherché à savoir si S. apiospermum était également en mesure de détourner certains xénosidérophores, et quels étaient les mécanismes mis en jeu. Pour ce faire, nous avons utilisé des xénosidérophores de structure et d'origine diverses, à savoir la ferrioxamine E et le ferrichrome, qui sont des tri-hydroxamates d'origine fongique, et la pyoverdine, qui est un composé mixte hydroxamate/catécholate produit par le bacille pyocyanique. Grâce aux mutants ΔsidD, nous avons pu montrer que S. apiospermum est capable d'utiliser la ferrioxamine E ou le ferrichrome sans intervention du N^{α} -méthylcoprogène B. Bien que la similitude structurale entre ces trois molécules (tri-hydroxamates) permette de spéculer sur l'implication des transporteurs SITs dans l'assimilation du fer porté par le ferrichrome et la ferrioxamine E, le rôle de la RIA ne peut être totalement exclu. Pourtant, l'internalisation de la ferrioxamine E par les SITs pourrait présenter un intérêt pour le diagnostic des infections à Scedosporium. En effet, l'utilisation de sidérophores radiomarqués (notamment la TAFC et la ferrioxamine E) a fait ses preuves pour le diagnostic des aspergilloses invasives [345]. Si la TAFC paraît hautement spécifique d'A. fumigatus, la ferrioxamine E, quant à elle, possède une sensibilité plus élevée tout en gardant une sélectivité vis-à-vis des organismes fongiques (*i.e.* pas d'interférence avec les bactéries). Le ferrichrome a également été testé dans ce contexte, mais ses caractéristiques (forte concentration sanguine, rétention dans les organes, et surtout instabilité chimique) ne permettent pas son implémentation en imagerie médicale [406]. A l'avenir, le PET-scan après injection de ferrioxamine E radiomarquée pourrait donc constituer un examen de choix pour le diagnostic scannographique des infections fongigues invasives, y compris les scédosporioses.

Contrairement aux hydroxamates « purs » dont l'assimilation se fait sans l'intervention du sidérophore endogène, nos expérimentations montrent que le N^{α} -méthylcoprogène B est un élément indispensable à l'assimilation du fer lié à la pyoverdine (sidérophore « mixte »). En effet, les mutants *AsidD* cultivés isolément (*i.e.* en l'absence de la souche sauvage ou de la souche parentale) étant incapables de se développer sur un milieu contenant ce xénosidérophore comme unique source de fer, l'implication des transporteurs SITs ou de la RIA peut être écartée [399]. Bien que l'affinité du N^{α} -méthylcoprogène B pour les ions Fe³⁺ (*via*, par exemple, la mesure du pFe, qui permet d'apprécier l'affinité d'un sidérophore pour les ions Fe³⁺ (voir §4.2.1. Assimilation médiée par les sidérophores) n'ait pu être quantifiée, cette observation nous semble très importante pour la compréhension de la physiopathologie des infections respiratoires dans la mucoviscidose. En effet, la spoliation du fer fixé à la pyoverdine par le N^{α} -méthylcoprogène B permettrait d'expliquer pourquoi la colonisation des poumons mucoviscidosiques par Scedosporium spp. confère une sorte de « protection » contre l'infection à P. aeruginosa [142]. Récemment, des études in vitro ont montré que les co-cultures de P. aeruginosa et de S. aurantiacum aboutissaient à l'inhibition partielle de la croissance du champignon, suggérant qu'une compétition s'établit entre les micro-organismes pour accéder aux ressources en fer [407-409]. A la différence de S. apiospermum, A. fumigatus est incapable d'utiliser la pyoverdine comme source de fer [327]. En lien avec ce constat, Sass et al. [327] ont démontré que P. aeruginosa était capable d'inhiber la croissance et la production de biofilm par A. fumigatus en provoquant une restriction en fer. A l'inverse, la production de sidérophores par A. fumigatus a montré un rôle protecteur contre l'inhibition médiée par la pyoverdine [410]. Par ailleurs, il semble que les modalités d'inhibition de la croissance de l'Aspergillus par P. aeruginosa varient en fonction de la quantité de fer disponible dans l'environnement [411]. En effet, dans un milieu supplémenté en fer, les surnageants de culture de P. aeruginosa, pourtant exempts de pyoverdine, conservent leur activité antifongique. Dans ces conditions, l'inhibition du biofilm d'A. fumigatus est dû à la présence de phénazines, comme la pyocyanine. En d'autres termes, P. aeruginosa recourt à différentes stratégies pour inhiber la croissance d'A. fumigatus, passant d'une privation du fer lorsque celui-ci se fait plus rare, à une action purement toxique [412] lorsque le fer est en quantité suffisante. Au total, bien qu'il existe désormais un faisceau d'arguments en faveur du rôle majeur joué par le fer et les sidérophores dans les relations inter-organismes, des investigations plus poussées, associant les données épidémiologiques à des études métabolomiques au sein du microbiote pulmonaire, demeurent nécessaires pour mieux appréhender les interactions bactéries-champignons qui se produisent au sein du mucus bronchique des patients atteints de mucoviscidose.

La capacité de *S. apiospermum* à s'approprier le fer des xénosidérophores a été appréciée *via* un nombre limité de composés (n = 3). Or, il est connu que certains agents fongiques produisent des SITs à spécificité « lâche », ce qui leur permet de rapatrier le fer à partir de sources diverses. Par exemple, *C. albicans* possède un seul transporteur SIT (CaArn1p/CaSit1p), qui est capable d'internaliser le fer complexé à une multitude de xénosidérophores comme le coprogène, la ferricrocine, la ferrichrysine, ou encore la triacétylfusarinine C [271]. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier la croissance de *S. apiospermum* en présence d'un lyophilisat de culture de différents champignons, notamment *A. fumigatus* (fusarinine C/TAFC), *A. niger* (coprogène B), *A. terreus* (ferrichrysine), *Rhizopus oryzae* (rhizoferrine), *Rhodotorula mucilaginosa* (acide rhodotorulique), ou encore les autres espèces du genre *Scedosporium* (N^{α} -méthylcoprogène B?).

Parallèlement, la capacité d'*A. fumigatus* à assimiler (ou non) le fer complexé au *N*^{*a*}-méthylcoprogène B mériterait d'être investiguée. En effet, les *Scedosporium* spp. colonisent tardivement les voies aériennes des patients atteints de mucoviscidose. Habituellement, la colonisation par *Scedosporium* spp. fait suite à la colonisation par *A. fumigatus* : ainsi, il existe une co-infection par *A. fumigatus* chez 75% des patients colonisés par *Scedosporium* [142]. La connaissance de l'aptitude de chacun de ces deux champignons à détourner les sidérophores de l'autre permettrait peut être de mieux comprendre leur co-existence dans le contexte de mucoviscidose, et la chronologie de la colonisation des voies respiratoires. En outre, la capacité des SITs des *Scedosporium* à internaliser la TAFC pourrait, tout comme la ferrioxamine E, être mise à profit pour une meilleure détection des scédosporioses par imagerie médicale.

La dernière partie de ce travail de thèse consistait en l'évaluation du rôle de *sidD* dans la virulence de *S. apiospermum*. Pour ce faire, nous avons utilisé un modèle murin de scédosporiose disséminée, qui constitue le gold-standard pour la détermination de la virulence. Ces expériences ont montré que la disruption de *sidD* s'accompagnait d'une absence quasi-totale de virulence chez *S. apiospermum*. Des résultats similaires ont également été rapportés chez d'autres champignons, comme *A. fumigatus, Fusarium graminearum, Bipolaris maydis* (anciennement *Cochliobolus heterostrophus*), *Bipolaris oryzae* (anciennement *Cochliobolus miyabeanus*), et *Alternaria brassicicola.* Les sidérophores constituent donc un dénominateur commun de la virulence pour les agents pathogènes des plantes et des mammifères [299,303].

La principale limitation de notre étude était l'incapacité à évaluer le rôle des sidérophores de S. apiospermum dans le développement d'une infection pulmonaire. En effet, dans le cadre des scédosporioses disséminées observées chez le transplanté d'organe solide comme chez le greffé de moelle osseuse, la contamination par Scedosporium se produit habituellement par inhalation de spores aéroportées, l'infection débutant par une atteinte pulmonaire [150]. Chez un hôte immunodéprimé, le foyer pulmonaire peut ensuite essaimer par voie sanguine, affectant plusieurs organes, y compris le système nerveux central. En outre, chez les patients atteints de mucoviscidose, les Scedosporium spp. figurent parmi les champignons filamenteux les plus fréquemment rencontrés dans les voies respiratoires, où ils sont habituellement considérés comme des « spectateurs ». Cependant, cette colonisation des voies respiratoires peut être à l'origine d'une infection pulmonaire invasive avec dissémination hématogène en cas de déficit immunitaire, lié à un diabète cortico-induit ou surtout à une transplantation (pulmonaire ou cœur-poumon, notamment). Chez les transplantés d'organe solide, les espèces du genre Scedosporium comptent pour environ 25% des infections fongiques invasives non-aspergillaires [413,414]. Ces infections présentent un taux de mortalité élevé malgré les traitements antifongiques, ce qui est principalement dû à la faible efficacité des molécules actuellement disponibles [415,416]. A ce titre, certains centres de transplantation considèrent que la colonisation des voies aériennes par Scedosporium spp. constitue une contre-indication à la greffe [414,417,418]. La greffe constituant aujourd'hui le traitement "ultime" pour certaines pathologies évolutives comme la mucoviscidose, la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques est donc cruciale pour améliorer la survie post-greffe des patients préalablement colonisés par *Scedosporium* spp. Le fait que nos mutants $\Delta sidD$ soient incapables de provoquer une infection disséminée démontre que le N^{α} -méthylcoprogène B est essentiel pour la virulence lorsque S. apiospermum se propage dans la circulation sanguine ; cependant, cela ne signifie pas qu'il est essentiel dans d'autres tissus, e.g. dans les voies respiratoires. Malheureusement, il n'existe actuellement

aucun modèle animal validé pour évaluer (i) la virulence des *Scedosporium* après inoculation de spores par voie intra-nasale ou intra-trachéale, ni (ii) leur capacité à coloniser les voies respiratoires chez des souris immunocompétentes, en particulier chez des animaux de phénotype CFTR^{-/-}. Néanmoins, comme déjà mentionné, du *N*^α-méthylcoprogène B a pu être détecté dans presque tous les échantillons de crachats issus de patients mucoviscidosiques et colonisés de façon chronique par *Scedosporium* spp. [347], ce qui suggère que le système sidérophore joue un rôle dans la persistance du champignon au niveau pulmonaire. Ainsi, les sidérophores de *Scedosporium* et plus globalement les sidérophores fongiques, qui sont synthétisés par la voie NRPS sans équivalent chez l'hôte mammifère, constitue une cible de choix pour le développement de nouvelles molécules antifongiques.

Au total, nos résultats ont révélé que le génome de *S. apiospermum* contient l'information génétique nécessaire à l'acquisition efficace du fer. Nous avons notamment prouvé que l'orthologue de *sidD* conduit à la synthèse d'un sidérophore extracellulaire unique, le N^{α} -méthylcoprogène B, qui s'est avéré essentiel pour la croissance fongique et la virulence. Ce composé semble important pour l'assimilation du fer à partir de la pyoverdine, ce qui pourrait expliquer l'antagonisme régulièrement rapporté entre *S. apiospermum* et *P. aeruginosa* dans le poumon mucoviscidosique. D'autres études incluant notamment l'évaluation des caractéristiques culturales et la virulence de mutants invalidés pour l'orthologue de *sidC* (codant une NRPS orchestrant la biosynthèse d'un sidérophore intracellulaire) sont également nécessaires pour distinguer les rôles respectifs des sidérophores intra et extracellulaires dans la pathogénicité du champignon et les mécanismes d'échappement à la réponse immune. Ces travaux, combinés à la mise en place récente du système CRISPR-Cas9 au laboratoire, ouvrent la voie à l'étude de gènes codant pour d'autres facteurs de virulence majeurs tels que les autres NRPSs, notamment celles impliquées dans la synthèse d'ETP.

Bibliographie

- 1. Farrell PM, White TB, Ren CL, Hempstead SE, Accurso F, Derichs N, et al. Diagnosis of cystic fibrosis: consensus guidelines from the Cystic Fibrosis Foundation. J Pediatr. 2017;181S: S4-S15.e1. doi:10.1016/j.jpeds.2016.09.064
- Bouchara J-P, Le Govic Y, Kabbara S, Cimon B, Zouhair R, Hamze M, et al. Advances in understanding and managing *Scedosporium* respiratory infections in patients with cystic fibrosis. Expert Rev Respir Med. 2020;14: 259–273. doi:10.1080/17476348.2020.1705787
- Kaltseis J, Rainer J, De Hoog GS. Ecology of *Pseudallescheria* and *Scedosporium* species in humandominated and natural environments and their distribution in clinical samples. Med Mycol. 2009;47: 398– 405. doi:10.1080/13693780802585317
- 4. Harun A, Gilgado F, Chen SC-A, 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: S70-76. doi:10.3109/13693786.2010.515254
- 5. Vandeputte P, Ghamrawi S, Rechenmann M, Iltis A, Giraud S, Fleury M, et al. Draft genome sequence of the pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. Genome Announcements. 2014;2. doi:10.1128/genomeA.00988-14
- 6. Pérez-Bercoff Å, Papanicolaou A, Ramsperger M, Kaur J, Patel HR, Harun A, et al. Draft genome of Australian environmental strain WM 09.24 of the opportunistic human pathogen *Scedosporium aurantiacum*. Genome Announcements. 2015;3. doi:10.1128/genomeA.01526-14
- Duvaux L, Shiller J, Vandeputte P, Dugé de Bernonville T, Thornton C, Papon N, et al. Draft genome sequence of the human-pathogenic Fungus *Scedosporium boydii*. Genome Announcements. 2017;5. doi:10.1128/genomeA.00871-17
- 8. Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Joechl C, Rogers T, Arst HN, et al. Siderophore biosynthesis but not reductive iron assimilation is essential for *Aspergillus fumigatus* virulence. J Exp Med. 2004;200: 1213–1219. doi:10.1084/jem.20041242
- 9. Bellis G, Dehillotte C, Lemonnier L. Registre français de la mucoviscidose Bilan des données 2017. Available: https://www.vaincrelamuco.org/sites/default/files/rapport_du_registre_-_donnees_2017.pdf
- 10. Fanconi G, Uehlinger E, Knauer C. Das coeliakie syndrom bei angeborener zystischer pankreasfibromatose und bronchiektasien. Wien Med Wochenschr. 86: 753–756.
- 11. Andersen DH. Cystic fibrosis of the pancreas and its relation to celiac disease: a clinical and pathological study. Am J Dis Child. 1938;56: 344–399. doi:10.1001/archpedi.1938.01980140114013
- 12. Farber S. Some organic digestive disturbances in early life. J MichState Med Soc. 1945;44: 587–594.
- 13. Andersen DH, Hodges RG. Celiac syndrome; genetics of cystic fibrosis of the pancreas, with a consideration of etiology. Am J Dis Child. 1946;72: 62–80. doi:10.1001/archpedi.1946.02020300069004
- 14. Kessler WR, Andersen DH. Heat prostration in fibrocystic disease of the pancreas and other conditions. Pediatrics. 1951;8: 648–656.
- 15. di Sant'Agnese PA, Darling RC, Perera GA, Shea E. Abnormal electrolyte composition of sweat in cystic fibrosis of the pancreas; clinical significance and relationship to the disease. Pediatrics. 1953;12: 549–563.
- 16. Quinton PM. Chloride impermeability in cystic fibrosis. Nature. 1983;301: 421–422. doi:10.1038/301421a0
- 17. Quinton PM, Bijman J. Higher bioelectric potentials due to decreased chloride absorption in the sweat glands of patients with cystic fibrosis. N Engl J Med. 1983;308: 1185–1189. doi:10.1056/NEJM198305193082002
- 18. Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. Science. 1989;245: 1073–1080. doi:10.1126/science.2570460

- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. Science. 1989;245: 1066–1073. doi:10.1126/science.2475911
- Rommens JM, Iannuzzi MC, Kerem B, Drumm ML, Melmer G, Dean M, et al. Identification of the cystic fibrosis gene: chromosome walking and jumping. Science. 1989;245: 1059–1065. doi:10.1126/science.2772657
- 21. Southern KW, Munck A, Pollitt R, Travert G, Zanolla L, Dankert-Roelse J, et al. A survey of newborn screening for cystic fibrosis in Europe. J Cyst Fibros. 2007;6: 57–65. doi:10.1016/j.jcf.2006.05.008
- Girodon-Boulandet E, Costa C. Génétique de la mucoviscidose. Médecine thérapeutique / Pédiatrie. 2005;8: 126–134.
- Zolin A, Orenti A, Naehrlich L, van Rens J et al. European Cystic Fibrosis Society (ECSF) Patient Registry. Annual data report (year 2017). 2019. Available: https://www.ecfs.eu/sites/default/files/general-contentimages/working-groups/ecfs-patient-registry/ECFSPR_Report2017_v1.3.pdf
- 24. Burgel P-R, Fajac I. Cystic fibrosis: Current aspects and perspectives. Presse Med. 2017;46: e85–e86. doi:10.1016/j.lpm.2017.06.001
- 25. Davis PB. Cystic Fibrosis Since 1938. Am J Respir Crit Care Med. 2006;173: 475–482. doi:10.1164/rccm.200505-8400E
- 26. Elborn JS. Cystic fibrosis. Lancet. 2016;388: 2519–2531. doi:10.1016/S0140-6736(16)00576-6
- Stephenson AL, Sykes J, Stanojevic S, Quon BS, Marshall BC, Petren K, et al. Survival comparison of patients with cystic fibrosis in Canada and the United States: a population-based cohort study. Ann Intern Med. 2017;166: 537–546. doi:10.7326/M16-0858
- 28. Burgel P-R, Bellis G, Olesen HV, Viviani L, Zolin A, Blasi F, et al. Future trends in cystic fibrosis demography in 34 European countries. Eur Respir J. 2015;46: 133–141. doi:10.1183/09031936.00196314
- 29. Lopes-Pacheco M. CFTR modulators: shedding light on precision medicine for cystic fibrosis. Front Pharmacol. 2016;7: 275. doi:10.3389/fphar.2016.00275
- Romey M-C. Caractérisation fonctionnelle de mutants CFTR naturels : intérêt pour la mucoviscidose. Ann Biol Clin. 2006;64: 429–437. doi:10.1684/abc.2006.0005
- 31. Hyde SC, Emsley P, Hartshorn MJ, Mimmack MM, Gileadi U, Pearce SR, et al. Structural model of ATPbinding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. Nature. 1990;346: 362–365. doi:10.1038/346362a0
- 32. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. J Lipid Res. 2001;42: 1007–1017.
- Gadsby DC, Vergani P, Csanády L. The ABC protein turned chloride channel whose failure causes cystic fibrosis. Nature. 2006;440: 477–483. doi:10.1038/nature04712
- 34. Collins FS. Cystic fibrosis: molecular biology and therapeutic implications. Science. 1992;256: 774–779. doi:10.1126/science.1375392
- 35. Rowe SM, Miller S, Sorscher EJ. Cystic fibrosis. N Engl J Med. 2005;352: 1992–2001. doi:10.1056/NEJMra043184
- Anderson MP, Gregory RJ, Thompson S, Souza DW, Paul S, Mulligan RC, et al. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. Science. 1991;253: 202–205. doi:10.1126/science.1712984

- 37. Linsdell P, Hanrahan JW. Glutathione permeability of CFTR. Am J Physiol. 1998;275: C323-326. doi:10.1152/ajpcell.1998.275.1.C323
- 38. Gabriel SE, Clarke LL, Boucher RC, Stutts MJ. CFTR and outward rectifying chloride channels are distinct proteins with a regulatory relationship. Nature. 1993;363: 263–268. doi:10.1038/363263a0
- 39. Stutts MJ, Canessa CM, Olsen JC, Hamrick M, Cohn JA, Rossier BC, et al. CFTR as a cAMP-dependent regulator of sodium channels. Science. 1995;269: 847–850. doi:10.1126/science.7543698
- 40. Schwiebert EM, Benos DJ, Egan ME, Stutts MJ, Guggino WB. CFTR is a conductance regulator as well as a chloride channel. Physiol Rev. 1999;79: S145-166. doi:10.1152/physrev.1999.79.1.S145
- 41. Boyle MP, De Boeck K. A new era in the treatment of cystic fibrosis: correction of the underlying CFTR defect. Lancet Respir Med. 2013;1: 158–163. doi:10.1016/S2213-2600(12)70057-7
- 42. Amaral MD. Novel personalized therapies for cystic fibrosis: treating the basic defect in all patients. J Intern Med. 2015;277: 155–166. doi:10.1111/joim.12314
- 43. Fajac I, De Boeck K. New horizons for cystic fibrosis treatment. Pharmacol Ther. 2017;170: 205–211. doi:10.1016/j.pharmthera.2016.11.009
- Taulan M, Lopez E, Guittard C, René C, Baux D, Altieri JP, et al. First functional polymorphism in CFTR promoter that results in decreased transcriptional activity and Sp1/USF binding. Biochem Biophys Res Commun. 2007;361: 775–781. doi:10.1016/j.bbrc.2007.07.091
- 45. Cant N, Pollock N, Ford RC. CFTR structure and cystic fibrosis. Int J Biochem Cell Biol. 2014;52: 15–25. doi:10.1016/j.biocel.2014.02.004
- 46. Ratjen F, Döring G. Cystic fibrosis. Lancet. 2003;361: 681–689. doi:10.1016/S0140-6736(03)12567-6
- 47. O'Sullivan BP, Freedman SD. Cystic fibrosis. Lancet. 2009;373: 1891–1904. doi:10.1016/S0140-6736(09)60327-5
- 48. Paranjape SM, Mogayzel PJ. Cystic fibrosis. Pediatr Rev. 2014;35: 194–205. doi:10.1542/pir.35-5-194
- 49. Farrell PM, Rosenstein BJ, White TB, Accurso FJ, Castellani C, Cutting GR, et al. Guidelines for diagnosis of cystic fibrosis in newborns through older adults: Cystic Fibrosis Foundation consensus report. J Pediatr. 2008;153: S4–S14. doi:10.1016/j.jpeds.2008.05.005
- 50. Mishra A, Greaves R, Massie J. The relevance of sweat testing for the diagnosis of cystic fibrosis in the genomic era. Clin Biochem Rev. 2005;26: 135–153.
- 51. Boué A, Muller F, Nezelof C, Oury JF, Duchatel F, Dumez Y, et al. Prenatal diagnosis in 200 pregnancies with a 1-in-4 risk of cystic fibrosis. Hum Genet. 1986;74: 288–297. doi:10.1007/bf00282551
- 52. Durie PR, Forstner GG. Pathophysiology of the exocrine pancreas in cystic fibrosis. J R Soc Med. 1989;82 Suppl 16: 2–10.
- 53. Kristidis P, Bozon D, Corey M, Markiewicz D, Rommens J, Tsui LC, et al. Genetic determination of exocrine pancreatic function in cystic fibrosis. Am J Hum Genet. 1992;50: 1178–1184.
- 54. Kerem E, Corey M, Kerem BS, Rommens J, Markiewicz D, Levison H, et al. The relation between genotype and phenotype in cystic fibrosis--analysis of the most common mutation (delta F508). N Engl J Med. 1990;323: 1517–1522. doi:10.1056/NEJM199011293232203
- 55. Johansen HK, Nir M, Høiby N, Koch C, Schwartz M. Severity of cystic fibrosis in patients homozygous and heterozygous for delta F508 mutation. Lancet. 1991;337: 631–634. doi:10.1016/0140-6736(91)92449-c
- 56. Liou TG, Adler FR, Fitzsimmons SC, Cahill BC, Hibbs JR, Marshall BC. Predictive 5-year survivorship model of cystic fibrosis. Am J Epidemiol. 2001;153: 345–352. doi:10.1093/aje/153.4.345

- 57. Sogni P, Hubert D, Chryssostalis A. [Liver complications in cystic fibrosis. Specific questions in adults?]. Gastroenterol Clin Biol. 2005;29: 1207–1210. doi:10.1016/s0399-8320(05)82201-8
- 58. Lamireau T, Monnereau S, Martin S, Marcotte J-E, Winnock M, Alvarez F. Epidemiology of liver disease in cystic fibrosis: a longitudinal study. J Hepatol. 2004;41: 920–925. doi:10.1016/j.jhep.2004.08.006
- 59. Colombo C, Battezzati PM, Crosignani A, Morabito A, Costantini D, Padoan R, et al. Liver disease in cystic fibrosis: A prospective study on incidence, risk factors, and outcome. Hepatology. 2002;36: 1374–1382. doi:10.1053/jhep.2002.37136
- Martin C, Hamard C, Kanaan R, Boussaud V, Grenet D, Abely M, et al. Étude des causes de décès des patients mucoviscidosiques en France : 2007–2010. Rev Mal Respir. 2015;32: A8–A9. doi:10.1016/j.rmr.2014.11.023
- 61. Strausbaugh SD, Davis PB. Cystic fibrosis: a review of epidemiology and pathobiology. Clin Chest Med. 2007;28: 279–288. doi:10.1016/j.ccm.2007.02.011
- 62. Ødegaard I, Stray-Pedersen B, Hallberg K, Haanaes OC, Storrøsten OT, Johannesson M. Prevalence and outcome of pregnancies in Norwegian and Swedish women with cystic fibrosis. Acta Obstet Gynecol Scand. 2002;81: 693–697.
- 63. Anguiano A, Oates RD, Amos JA, Dean M, Gerrard B, Stewart C, et al. Congenital bilateral absence of the vas deferens. A primarily genital form of cystic fibrosis. JAMA. 1992;267: 1794–1797.
- 64. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. N Engl J Med. 1995;332: 1475–1480. doi:10.1056/NEJM199506013322204
- Munck A, Cheillan D, Girodon E, Nguyen Khoa T, Wizla N, Audrezet M-P, et al. Dépistage néonatal de la mucoviscidose en France: aspects pratiques et perspectives. Perf Ped. 2019;2: 163–171. doi:10.1016/j.perped.2019.04.019
- 66. Sarles J, Giorgi R, Berthézène P, Munck A, Cheillan D, Dagorn J-C, et al. Neonatal screening for cystic fibrosis: comparing the performances of IRT/DNA and IRT/PAP. J Cyst Fibros. 2014;13: 384–390. doi:10.1016/j.jcf.2014.01.004
- 67. Haute Autorité de Santé. Place de la stratégie couplant les dosages de la trypsine immunoréactive (TIR) et de la protéine associée à la pancréatite (PAP) dans le dépistage systématique de la mucoviscidose en France. Saint-Denis La Plaine : HAS; 2015. Available: https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2015-06/place_de_la_strategie_couplant_les_dosages_de_la_tir_et_de_la_pap_dans_le_depistage_systematique _de_la_mucoviscidose_en_france.pdf
- Grenouillet F, Cimon B, Pana-Katatali H, Person C, Gainet-Brun M, Malinge M-C, et al. *Exophiala* dermatitidis revealing cystic fibrosis in adult patients with chronic pulmonary disease. Mycopathologia. 2018;183: 71–79. doi:10.1007/s11046-017-0218-5
- 69. Kerr C, Morrissy D, Horgan M, Plant BJ. Microbial clues lead to a diagnosis of cystic fibrosis in late adulthood. BMJ Case Rep. 2020;13. doi:10.1136/bcr-2019-233470
- Coman T, Fajac I, Bienvenu T, Desmazes-Dufeu N, Hubert D, Kanaan R, et al. [The diagnosis of cystic fibrosis in adults: lessons from a family story]. Rev Mal Respir. 2009;26: 67–73. doi:10.1016/s0761-8425(09)70137-8
- 71. Elborn JS. Personalised medicine for cystic fibrosis: treating the basic defect. Eur Respir Rev. 2013;22: 3– 5. doi:10.1183/09059180.00008112
- 72. Lebecque O, Leal T, Lebecque P. Mucoviscidose : le tournant des modulateurs. Louvain Med. 2019;138(2): 126-136.

- 73. Lopes-Pacheco M. CFTR modulators: the changing face of cystic fibrosis in the era of precision medicine. Front Pharmacol. 2019;10: 1662. doi:10.3389/fphar.2019.01662
- 74. Christopher Boyd A, Guo S, Huang L, Kerem B, Oren YS, Walker AJ, et al. New approaches to genetic therapies for cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2020;19 Suppl 1: S54–S59. doi:10.1016/j.jcf.2019.12.012
- Hughes DL. Patent review of synthetic routes and crystalline forms of the CFTR-modulator drugs ivacaftor, lumacaftor, tezacaftor, and elexacaftor. Org Process Res Dev. 2019;23: 2302–2322. doi:10.1021/acs.oprd.9b00326
- 76. Zhang L, Button B, Gabriel SE, Burkett S, Yan Y, Skiadopoulos MH, et al. CFTR delivery to 25% of surface epithelial cells restores normal rates of mucus transport to human cystic fibrosis airway epithelium. PLoS Biol. 2009;7: e1000155. doi:10.1371/journal.pbio.1000155
- 77. Van Goor F, Hadida S, Grootenhuis PDJ, Burton B, Cao D, Neuberger T, et al. Rescue of CF airway epithelial cell function in vitro by a CFTR potentiator, VX-770. Proc Natl Acad Sci USA. 2009;106: 18825–18830. doi:10.1073/pnas.0904709106
- Accurso FJ, Rowe SM, Clancy JP, Boyle MP, Dunitz JM, Durie PR, et al. Effect of VX-770 in persons with cystic fibrosis and the G551D-CFTR mutation. N Engl J Med. 2010;363: 1991–2003. doi:10.1056/NEJMoa0909825
- Accurso FJ, Van Goor F, Zha J, Stone AJ, Dong Q, Ordonez CL, et al. Sweat chloride as a biomarker of CFTR activity: proof of concept and ivacaftor clinical trial data. J Cyst Fibros. 2014;13: 139–147. doi:10.1016/j.jcf.2013.09.007
- De Boeck K, Munck A, Walker S, Faro A, Hiatt P, Gilmartin G, et al. Efficacy and safety of ivacaftor in patients with cystic fibrosis and a non-G551D gating mutation. J Cyst Fibros. 2014;13: 674–680. doi:10.1016/j.jcf.2014.09.005
- 81. Welch EM, Barton ER, Zhuo J, Tomizawa Y, Friesen WJ, Trifillis P, et al. PTC124 targets genetic disorders caused by nonsense mutations. Nature. 2007;447: 87–91. doi:10.1038/nature05756
- Kerem E, Hirawat S, Armoni S, Yaakov Y, Shoseyov D, Cohen M, et al. Effectiveness of PTC124 treatment of cystic fibrosis caused by nonsense mutations: a prospective phase II trial. Lancet. 2008;372: 719–727. doi:10.1016/S0140-6736(08)61168-X
- 83. Sermet-Gaudelus I, Boeck KD, Casimir GJ, Vermeulen F, Leal T, Mogenet A, et al. Ataluren (PTC124) induces cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein expression and activity in children with nonsense mutation cystic fibrosis. Am J Respir Crit Care Med. 2010;182: 1262–1272. doi:10.1164/rccm.201001-01370C
- Kerem E, Konstan MW, De Boeck K, Accurso FJ, Sermet-Gaudelus I, Wilschanski M, et al. Ataluren for the treatment of nonsense-mutation cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. Lancet Respir Med. 2014;2: 539–547. doi:10.1016/S2213-2600(14)70100-6
- 85. Konstan MW, VanDevanter DR, Rowe SM, Wilschanski M, Kerem E, Sermet-Gaudelus I, et al. Efficacy and safety of ataluren in patients with nonsense-mutation cystic fibrosis not receiving chronic inhaled aminoglycosides: The international, randomized, double-blind, placebo-controlled Ataluren Confirmatory Trial in Cystic Fibrosis (ACT CF). J Cyst Fibros. 2020. doi:10.1016/j.jcf.2020.01.007
- Lee TWR, Southern KW. Topical cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene replacement for cystic fibrosis-related lung disease. Cochrane Database Syst Rev. 2013; CD005599. doi:10.1002/14651858.CD005599.pub4
- Alton EWFW, Armstrong DK, Ashby D, Bayfield KJ, Bilton D, Bloomfield EV, et al. Repeated nebulisation of non-viral *CFTR* gene therapy in patients with cystic fibrosis: a randomised, double-blind, placebocontrolled, phase 2b trial. Lancet Respir Med. 2015;3: 684–691. doi:10.1016/S2213-2600(15)00245-3

- Alton EWFW, Beekman JM, Boyd AC, Brand J, Carlon MS, Connolly MM, et al. Preparation for a first-in-man lentivirus trial in patients with cystic fibrosis. Thorax. 2017;72: 137–147. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-208406
- 89. Slaymaker IM, Gao L, Zetsche B, Scott DA, Yan WX, Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. Science. 2016;351: 84–88. doi:10.1126/science.aad5227
- 90. Blanchard AC, Waters VJ. Microbiology of cystic fibrosis airway disease. Semin Respir Crit Care Med. 2019;40: 727–736. doi:10.1055/s-0039-1698464
- 91. Brestovac B, Lawrence C, Speers DJ, Sammels LM, Mulrennan S. Respiratory viral infections in Western Australians with cystic fibrosis. Respir Med. 2020;161: 105854. doi:10.1016/j.rmed.2019.105854
- 92. Gilligan PH. Infections in patients with cystic fibrosis: diagnostic microbiology update. Clin Lab Med. 2014;34: 197–217. doi:10.1016/j.cll.2014.02.001
- 93. Hizal M, Yalcin E, Alp A, Ozden M, Karakaya J, Eryilmaz Polat S, et al. Respiratory viruses: What is their role in acute exacerbations in children with cystic fibrosis? Pediatr Pulmonol. 2020. doi:10.1002/ppul.24750
- 94. Deschamp AR, Hatch JE, Slaven JE, Gebregziabher N, Storch G, Hall GL, et al. Early respiratory viral infections in infants with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2019;18: 844–850. doi:10.1016/j.jcf.2019.02.004
- 95. Lipuma JJ. The changing microbial epidemiology in cystic fibrosis. Clin Microbiol Rev. 2010;23: 299–323. doi:10.1128/CMR.00068-09
- 96. Korten I, Kieninger E, Klenja S, Mack I, Schläpfer N, Barbani MT, et al. Respiratory viruses in healthy infants and infants with cystic fibrosis: a prospective cohort study. Thorax. 2018;73: 13–20. doi:10.1136/thoraxjnl-2016-209553
- Jönsson BE, Gilljam M, Lindblad A, Ridell M, Wold AE, Welinder-Olsson C. Molecular epidemiology of *Mycobacterium abscessus*, with focus on cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2007;45: 1497–1504. doi:10.1128/JCM.02592-06
- 98. Cuthbertson L, Walker AW, Oliver AE, Rogers GB, Rivett DW, Hampton TH, et al. Lung function and microbiota diversity in cystic fibrosis. Microbiome. 2020;8: 45. doi:10.1186/s40168-020-00810-3
- 99. Soret P, Vandenborght L-E, Francis F, Coron N, Enaud R, Avalos M, et al. Respiratory mycobiome and suggestion of inter-kingdom network during acute pulmonary exacerbation in cystic fibrosis. Sci Rep. 2020;10: 3589. doi:10.1038/s41598-020-60015-4
- 100. 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: 387–397. doi:10.1080/13693780802609604
- 101. Van Grunderbeeck N, Conseil V, Leroy S, Wallaert B, Delhaes L. [The fungal risk in cystic fibrosis: a pilot study]. Ann Biol Clin. 2010;68: 157–162. doi:10.1684/abc.2010.0404
- 102. 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. doi:10.3109/13693786.2010.511287
- 103. 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. 2018;183: 101–117. doi:10.1007/s11046-017-0173-1
- 104. Cimon B, Chabasse D, Bouchara J-P. Rôle des champignons dans la pathologie respiratoire au cours de la mucoviscidose. Rev Franc Lab. 2008. doi:RFL-12-2007-00-397-50834-101019-200705754

- 105. Chmiel JF, Aksamit TR, Chotirmall SH, Dasenbrook EC, Elborn JS, LiPuma JJ, et al. Antibiotic management of lung infections in cystic fibrosis. II. Nontuberculous mycobacteria, anaerobic bacteria, and fungi. Ann Am Thorac Soc. 2014;11: 1298–1306. doi:10.1513/AnnalsATS.201405-203AS
- 106. Valenza G, Tappe D, Turnwald D, Frosch M, König C, Hebestreit H, et al. Prevalence and antimicrobial susceptibility of microorganisms isolated from sputa of patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2008;7: 123–127. doi:10.1016/j.jcf.2007.06.006
- 107. Hector A, Kirn T, Ralhan A, Graepler-Mainka U, Berenbrinker S, Riethmueller J, et al. Microbial colonization and lung function in adolescents with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2016;15: 340–349. doi:10.1016/j.jcf.2016.01.004
- 108. Chotirmall SH, O'Donoghue E, Bennett K, Gunaratnam C, O'Neill SJ, McElvaney NG. Sputum Candida albicans presages FEV₁ decline and hospital-treated exacerbations in cystic fibrosis. Chest. 2010;138: 1186–1195. doi:10.1378/chest.09-2996
- 109. Gileles-Hillel A, Shoseyov D, Polacheck I, Korem M, Kerem E, Cohen-Cymberknoh M. Association of chronic Candida albicans respiratory infection with a more severe lung disease in patients with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2015;50: 1082–1089. doi:10.1002/ppul.23302
- 110. Wahab AA, Taj-Aldeen SJ, Kolecka A, ElGindi M, Finkel JS, Boekhout T. High prevalence of *Candida dubliniensis* in lower respiratory tract secretions from cystic fibrosis patients may be related to increased adherence properties. Int J Infect Dis. 2014;24: 14–19. doi:10.1016/j.ijid.2014.03.1380
- 111. Peltroche-Llacsahuanga H, Döhmen H, Haase G. Recovery of *Candida dubliniensis* from sputum of cystic fibrosis patients. Mycoses. 2002;45: 15–18.
- 112. Hickey PW, Sutton DA, Fothergill AW, Rinaldi MG, Wickes BL, Schmidt HJ, et al. *Trichosporon mycotoxinivorans*, a novel respiratory pathogen in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2009;47: 3091–3097. doi:10.1128/JCM.00460-09
- 113. Almeida JN de, Francisco EC, Barberino MGM de A, Silva LVRF da, Brandão OM, Colombo AL, et al. Emergence of *Trichosporon mycotoxinivorans* (*Apiotrichum mycotoxinivorans*) invasive infections in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2017;112: 719–722. doi:10.1590/0074-02760170011
- 114. Martínez Muñiz F de B, Martínez Redondo M, Prados Sánchez C, García Rodríguez J. Chronic lung infection caused by *Trichosporon mycotoxinivorans* and *Trichosporon mucoides* in an immunocompetent cystic fibrosis patient. Arch Bronconeumol. 2016;52: 400. doi:10.1016/j.arbres.2015.11.013
- 115. Esther CR, Plongla R, Kerr A, Lin F-C, Gilligan P. Clinical outcomes in cystic fibrosis patients with *Trichosporon* respiratory infection. J Cyst Fibros. 2016;15: e45-e49. doi:10.1016/j.jcf.2016.02.006
- 116. Jahn K, Baettig V, Seth-Smith HMB, Egli A, Tamm M. Rare cases of *Blastobotrys raffinosifermentans* as cause of FEV1 decline in two CF patients Whole genome sequencing to exclude transmission. J Cyst Fibros. 2018;17: e17–e19. doi:10.1016/j.jcf.2017.11.012
- 117. Wong JY, Chambers AL, Fuller J, Lacson A, Mullen J, Lien D, et al. Successful lung transplant in a child with cystic fibrosis and persistent *Blastobotrys rhaffinosifermentans* infection. Pediatr Transplant. 2014;18: E169-173. doi:10.1111/petr.12294
- 118. Roehmel JF, Tintelnot K, Bernhardt A, Seibold M, Staab D, Schwarz C. Arxula adeninivorans causing invasive pulmonary mycosis and fungaemia in cystic fibrosis. Lancet. 2015;385: 1476. doi:10.1016/S0140-6736(15)60260-4
- 119. Masoud-Landgraf L, Badura A, Eber E, Feierl G, Marth E, Buzina W. Modified culture method detects a high diversity of fungal species in cystic fibrosis patients. Med Mycol. 2014;52: 179–186. doi:10.3109/13693786.2013.792438
- Warris A, Bercusson A, Armstrong-James D. Aspergillus colonization and antifungal immunity in cystic fibrosis patients. Med Mycol. 2019;57: S118–S126. doi:10.1093/mmy/myy074

- 121. 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: S32-36. doi:10.3109/13693786.2010.503665
- 122. Ziesing S, Suerbaum S, Sedlacek L. Fungal epidemiology and diversity in cystic fibrosis patients over a 5year period in a national reference center. Med Mycol. 2016;54: 781–786. doi:10.1093/mmy/myw035
- 123. Vanhee LME, Symoens F, Bouchara J-P, Nelis HJ, Coenye T. High-resolution genotyping of *Aspergillus fumigatus* isolates recovered from chronically colonised patients with cystic fibrosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2008;27: 1005–1007. doi:10.1007/s10096-008-0527-1
- 124. Rougeron A, Giraud S, Razafimandimby B, Meis JF, Bouchara J-P, Klaassen CHW. Different colonization patterns of *Aspergillus terreus* in patients with cystic fibrosis. Clin Microbiol Infect. 2014;20: 327–333. doi:10.1111/1469-0691.12323
- 125. de Valk HA, Klaassen CHW, Yntema J-B, Hebestreit A, Seidler M, Haase G, et al. Molecular typing and colonization patterns of *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis. J Cyst Fibros. 2009;8: 110–114. doi:10.1016/j.jcf.2008.10.003
- 126. Cimon B, Symoens F, Zouhair R, Chabasse D, Nolard N, Defontaine A, et al. Molecular epidemiology of airway colonisation by *Aspergillus fumigatus* in cystic fibrosis patients. J Med Microbiol. 2001;50: 367–374. doi:10.1099/0022-1317-50-4-367
- 127. Jubin V, Ranque S, Stremler Le Bel N, Sarles J, Dubus J-C. Risk factors for Aspergillus colonization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in children with cystic fibrosis. Pediatr Pulmonol. 2010;45: 764– 771. doi:10.1002/ppul.21240
- 128. Navarro J, Rainisio M, Harms HK, Hodson ME, Koch C, Mastella G, et al. Factors associated with poor pulmonary function: cross-sectional analysis of data from the ERCF. European Epidemiologic Registry of Cystic Fibrosis. Eur Respir J. 2001;18: 298–305. doi:10.1183/09031936.01.00068901
- 129. Amin R, Dupuis A, Aaron SD, Ratjen F. The effect of chronic infection with *Aspergillus fumigatus* on lung function and hospitalization in patients with cystic fibrosis. Chest. 2010;137: 171–176. doi:10.1378/chest.09-1103
- 130. King J, Brunel SF, Warris A. *Aspergillus* infections in cystic fibrosis. J Infect. 2016;72 Suppl: S50-55. doi:10.1016/j.jinf.2016.04.022
- 131. Singh A, Ralhan A, Schwarz C, Hartl D, Hector A. Fungal pathogens in CF airways: leave or treat? Mycopathologia. 2018;183: 119–137. doi:10.1007/s11046-017-0184-y
- 132. Maturu VN, Agarwal R. Prevalence of *Aspergillus* sensitization and allergic bronchopulmonary aspergillosis in cystic fibrosis: systematic review and meta-analysis. Clin Exp Allergy. 2015;45: 1765–1778. doi:10.1111/cea.12595
- 133. Hassanzad M, Mortezaee V, Bongomin F, Poorabdollah M, Sharifynia S, Maleki M, et al. Successful control of exacerbation of allergic bronchopulmonary aspergillosis due to *Aspergillus terreus* in a cystic fibrosis patient with short-term adjunctive therapy with voriconazole: a case report. J Mycol Med. 2019;29: 189–192. doi:10.1016/j.mycmed.2019.02.001
- 134. Iversen M, Burton CM, Vand S, Skovfoged L, Carlsen J, Milman N, et al. *Aspergillus* infection in lung transplant patients: incidence and prognosis. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2007;26: 879–886. doi:10.1007/s10096-007-0376-3
- 135. Luong M-L, Chaparro C, Stephenson A, Rotstein C, Singer LG, Waters V, et al. Pretransplant *Aspergillus* colonization of cystic fibrosis patients and the incidence of post-lung transplant invasive aspergillosis. Transplantation. 2014;97: 351–357. doi:10.1097/01.TP.0000437434.42851.d4
- 136. Burgel P-R, Paugam A, Hubert D, Martin C. *Aspergillus fumigatus* in the cystic fibrosis lung: pros and cons of azole therapy. Infect Drug Resist. 2016;9: 229–238. doi:10.2147/IDR.S63621

- 137. Prigitano A, Esposto MC, Biffi A, De Lorenzis G, Favuzzi V, Koncan R, et al. Triazole resistance in *Aspergillus fumigatus* isolates from patients with cystic fibrosis in Italy. J Cyst Fibros. 2017;16: 64–69. doi:10.1016/j.jcf.2016.06.006
- 138. Hamprecht A, Morio F, Bader O, Le Pape P, Steinmann J, Dannaoui E. Azole resistance in *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis: a matter of concern? Mycopathologia. 2018;183: 151–160. doi:10.1007/s11046-017-0162-4
- 139. Seufert R, Sedlacek L, Kahl B, Hogardt M, Hamprecht A, Haase G, et al. Prevalence and characterization of azole-resistant *Aspergillus fumigatus* in patients with cystic fibrosis: a prospective multicentre study in Germany. J Antimicrob Chemother. 2018;73: 2047–2053. doi:10.1093/jac/dky147
- 140. Lavergne R-A, Morio F, Favennec L, Dominique S, Meis JF, Gargala G, et al. First description of azoleresistant *Aspergillus fumigatus* due to TR46/Y121F/T289A mutation in France. Antimicrob Agents Chemother. 2015;59: 4331–4335. doi:10.1128/AAC.00127-15
- 141. Lavergne R-A, Morio F, Danner-Boucher I, Horeau-Langlard D, David V, Hagen F, et al. One year prospective survey of azole resistance in *Aspergillus fumigatus* at a French cystic fibrosis reference centre: prevalence and mechanisms of resistance. J Antimicrob Chemother. 2019;74: 1884–1889. doi:10.1093/jac/dkz144
- 142. Blyth CC, Middleton PG, Harun A, Sorrell TC, Meyer W, Chen SC-A. 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. doi:10.3109/13693786.2010.500627
- 143. de Jong CCM, Slabbers L, Engel TGP, Yntema JB, van Westreenen M, Croughs PD, et al. Clinical relevance of *Scedosporium* spp. and *Exophiala dermatitidis* in patients with cystic fibrosis: a nationwide study. Med Mycol. 2020. doi:10.1093/mmy/myaa003
- 144. Larcher G, Cimon B, Symoens F, Tronchin G, Chabasse D, Bouchara JP. A 33 kDa serine proteinase from *Scedosporium apiospermum*. Biochem J. 1996;315 (Pt 1): 119–126. doi:10.1042/bj3150119
- 145. 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: 558–565. doi:10.1016/j.micinf.2007.01.027
- 146. Han Z, Kautto L, Nevalainen H. Secretion of proteases by an opportunistic fungal pathogen *Scedosporium aurantiacum*. PLoS One. 2017;12: e0169403. doi:10.1371/journal.pone.0169403
- 147. Rodriguez-Tudela JL, Berenguer J, Guarro J, Kantarcioglu AS, Horre R, de Hoog GS, et al. Epidemiology and outcome of *Scedosporium prolificans* infection, a review of 162 cases. Med Mycol. 2009;47: 359–370. doi:10.1080/13693780802524506
- 148. Tintelnot K, Just-Nübling G, Horré R, Graf B, Sobottka I, Seibold M, et al. A review of German *Scedosporium prolificans* cases from 1993 to 2007. Med Mycol. 2009;47: 351–358. doi:10.1080/13693780802627440
- 149. Lackner M, Rezusta A, Villuendas MC, Palacian MP, Meis JF, Klaassen CH. Infection and colonisation due to *Scedosporium* in Northern Spain. An in vitro antifungal susceptibility and molecular epidemiology study of 60 isolates. Mycoses. 2011;54 Suppl 3: 12–21. doi:10.1111/j.1439-0507.2011.02110.x
- 150. Ramirez-Garcia A, Pellon A, Rementeria A, Buldain I, Barreto-Bergter E, Rollin-Pinheiro R, et al. *Scedosporium* and *Lomentospora*: an updated overview of underrated opportunists. Med Mycol. 2018;56: 102–125. doi:10.1093/mmy/myx113
- 151. Cimon B, Carrere J, Chazalette JP, Vinatier JF, Chabasse D, Bouchara JP. Chronic airway colonization by *Penicillium emersonii* in a patient with cystic fibrosis. Med Mycol. 1999;37: 291–293.

- 152. Giraud S, Pihet M, Razafimandimby B, Carrère J, Degand N, Mely L, et al. *Geosmithia argillacea*: an emerging pathogen in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2010;48: 2381–2386. doi:10.1128/JCM.00047-10
- 153. Giraud S, Favennec L, Bougnoux M-E, Bouchara J-P. *Rasamsonia argillacea* species complex: taxonomy, pathogenesis and clinical relevance. Future Microbiol. 2013;8: 967–978. doi:10.2217/fmb.13.63
- 154. Barton RC, Borman AM, Johnson EM, Houbraken J, Hobson RP, Denton M, et al. Isolation of the fungus *Geosmithia argillacea* in sputum of people with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2010;48: 2615–2617. doi:10.1128/JCM.00184-10
- 155. Mouhajir A, Matray O, Giraud S, Mély L, Marguet C, Sermet-Gaudelus I, et al. Long-term *Rasamsonia argillacea* complex species colonization revealed by PCR amplification of repetitive DNA sequences in cystic fibrosis patients. J Clin Microbiol. 2016;54: 2804–2812. doi:10.1128/JCM.01462-16
- 156. Abdolrasouli A, Bercusson AC, Rhodes JL, Hagen F, Buil JB, Tang AYY, et al. Airway persistence by the emerging multi-azole-resistant *Rasamsonia argillacea* complex in cystic fibrosis. Mycoses. 2018;61: 665–673. doi:10.1111/myc.12789
- 157. Houbraken J, Giraud S, Meijer M, Bertout S, Frisvad JC, Meis JF, et al. Taxonomy and antifungal susceptibility of clinically important *Rasamsonia* species. J Clin Microbiol. 2013;51: 22–30. doi:10.1128/JCM.02147-12
- 158. Marguet C, Favennec L, Matray O, Bertout S, Giraud S, Couderc L, et al. Clinical and microbiological efficacy of micafungin on *Geosmithia argillacea* infection in a cystic fibrosis patient. Med Mycol Case Rep. 2012;1: 79–81. doi:10.1016/j.mmcr.2012.08.004
- 159. Labbé F, Babchia S, Evreux F, Chenal P. [Isolation of *Geosmithia argillacea* in a cystic fibrosis patient]. J Mycol Med. 2013;23: 176–178. doi:10.1016/j.mycmed.2013.05.003
- 160. Matos T, Cerar T, Praprotnik M, Krivec U, Pirš M. First recovery of *Rasamsonia argillacea* species complex isolated in adolescent patient with cystic fibrosis in Slovenia--case report and review of literature. Mycoses. 2015;58: 506–510. doi:10.1111/myc.12340
- 161. Hong G, White M, Lechtzin N, West NE, Avery R, Miller H, et al. Fatal disseminated *Rasamsonia* infection in cystic fibrosis post-lung transplantation. J Cyst Fibros. 2017;16: e3–e7. doi:10.1016/j.jcf.2017.01.005
- 162. Machouart M, Garcia-Hermoso D, Rivier A, Hassouni N, Catherinot E, Salmon A, et al. Emergence of disseminated infections due to *Geosmithia argillacea* in patients with chronic granulomatous disease receiving long-term azole antifungal prophylaxis. J Clin Microbiol. 2011;49: 1681–1683. doi:10.1128/JCM.02456-10
- 163. De Ravin SS, Challipalli M, Anderson V, Shea YR, Marciano B, Hilligoss D, et al. *Geosmithia argillacea*: an emerging cause of invasive mycosis in human chronic granulomatous disease. Clin Infect Dis. 2011;52: e136-143. doi:10.1093/cid/ciq250
- 164. Ishiwada N, Takeshita K, Yaguchi T, Nagasawa K, Takeuchi N, Hishiki H, 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: 305–309. doi:10.1007/s11046-015-9963-5
- 165. Ocak I, Bollino G, Bering P, Sciortino C, Cavalcante J. *Rasamsonia argillacea* species complex myocarditis in a patient with chronic granulomatous disease. Radiol Case Rep. 2019;14: 766–770. doi:10.1016/j.radcr.2019.03.035
- 166. Babiker A, Gupta N, Gibas CFC, Wiederhold NP, Sanders C, Mele J, et al. *Rasamsonia* sp: an emerging infection amongst chronic granulomatous disease patients. A case of disseminated infection by a putatively novel *Rasamsonia argillacea* species complex involving the heart. Med Mycol Case Rep. 2019;24: 54–57. doi:10.1016/j.mmcr.2019.04.002

- 167. Stemler J, Salmanton-García J, Seidel D, Alexander BD, Bertz H, Hoenigl M, et al. Risk factors and mortality in invasive *Rasamsonia* spp. infection: Analysis of cases in the FungiScope® registry and from the literature. Mycoses. 2020;63: 265–274. doi:10.1111/myc.13039
- 168. Schwarz C, Bouchara J-P, Buzina W, Chrenkova V, Dmeńska H, de la Pedrosa EGG, et al. Organization of patient management and fungal epidemiology in cystic fibrosis. Mycopathologia. 2018;183: 7–19. doi:10.1007/s11046-017-0205-x
- 169. Haase G, Skopnik H, Kusenbach G. *Exophiala dermatitidis* infection in cystic fibrosis. Lancet. 1990;336: 188–189. doi:10.1016/0140-6736(90)91721-l
- 170. Horré R, Schaal KP, Siekmeier R, Sterzik B, de Hoog GS, Schnitzler N. Isolation of fungi, especially *Exophiala dermatitidis*, in patients suffering from cystic fibrosis. A prospective study. Respiration. 2004;71: 360–366. doi:10.1159/000079640
- 171. Lebecque P, Leonard A, Huang D, Reychler G, Boeras A, Leal T, et al. *Exophiala (Wangiella)* dermatitidis and cystic fibrosis - Prevalence and risk factors. Medical Mycology. 2010;48 Suppl 1: S4-9. doi:10.3109/13693786.2010.495731
- 172. 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: 1004–1009. doi:10.1128/JCM.01899-10
- 173. Matos T, de Hoog GS, de Boer AG, de Crom I, Haase G. High prevalence of the neurotrope *Exophiala dermatitidis* and related oligotrophic black yeasts in sauna facilities. Mycoses. 2002;45: 373–377. doi:10.1046/j.1439-0507.2002.00779.x
- 174. Zalar P, Novak M, de Hoog GS, Gunde-Cimerman N. Dishwashers--a man-made ecological niche accommodating human opportunistic fungal pathogens. Fungal Biol. 2011;115: 997–1007. doi:10.1016/j.funbio.2011.04.007
- 175. Zupančič J, Novak Babič M, Zalar P, Gunde-Cimerman N. The black yeast *Exophiala dermatitidis* and other selected opportunistic human fungal pathogens spread from dishwashers to kitchens. PLoS One. 2016;11: e0148166. doi:10.1371/journal.pone.0148166
- 176. Döğen A, Kaplan E, Oksüz Z, Serin MS, Ilkit M, de Hoog GS. Dishwashers are a major source of human opportunistic yeast-like fungi in indoor environments in Mersin, Turkey. Med Mycol. 2013;51: 493–498. doi:10.3109/13693786.2012.738313
- 177. Horré R, Marklein G, Siekmeier R, Reiffert S-M. Detection of hyphomycetes in the upper respiratory tract of patients with cystic fibrosis. Mycoses. 2011;54: 514–522. doi:10.1111/j.1439-0507.2010.01897.x
- 178. González-Escalada A, Del Palacio A, Calvo MT, Gené J, Guarro J. [Two cases of scalp wound colonization and respiratory tract by mycelial fungi]. Rev Iberoam Micol. 2000;17: 149–151.
- 179. Cimon B, Challier S, Béguin H, Carrère J, Chabasse D, Bouchara J-P. Airway colonization by *Acrophialophora fusispora* in patients with cystic fibrosis. J Clin Microbiol. 2005;43: 1484–1487. doi:10.1128/JCM.43.3.1484-1487.2005
- Keller NP, Turner G, Bennett JW. Fungal secondary metabolism from biochemistry to genomics. Nat Rev Microbiol. 2005;3: 937–947. doi:10.1038/nrmicro1286
- 181. Mach B, Reich E, Tatum EL. Separation of the biosynthesis of the antibiotic polypeptide tyrocidine from protein biosynthesis. Proc Natl Acad Sci USA. 1963;50: 175–181. doi:10.1073/pnas.50.1.175
- 182. Fujikawa K, Suzuki T, Kurahashi K. Incorporation of L-leucine-C14 into tyrocidine by a cell-free preparation of *Bacillus brevis* Dubos strain. J Biochem. 1966;60: 216–218. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a128421
- 183. Tomino S, Yamada M, Itoh H, Kurahashik null. Cell-free synthesis of gramicidin S. Biochemistry. 1967;6: 2552–2560. doi:10.1021/bi00860a037
- 184. Lipmann F, Gevers W, Kleinkauf H, Roskoski R. Polypeptide synthesis on protein templates: the enzymatic synthesis of gramicidin S and tyrocidine. Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol. 1971;35: 1–34. doi:10.1002/9780470122808.ch1
- 185. Demain AL. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their discovery. J Ind Microbiol Biotechnol. 2014;41: 185–201. doi:10.1007/s10295-013-1325-z
- 186. Calteau A, Fewer DP, Latifi A, Coursin T, Laurent T, Jokela J, et al. Phylum-wide comparative genomics unravel the diversity of secondary metabolism in Cyanobacteria. BMC Genomics. 2014;15: 977. doi:10.1186/1471-2164-15-977
- 187. Wang H, Fewer DP, Holm L, Rouhiainen L, Sivonen K. Atlas of nonribosomal peptide and polyketide biosynthetic pathways reveals common occurrence of nonmodular enzymes. Proc Natl Acad Sci USA. 2014;111: 9259–9264. doi:10.1073/pnas.1401734111
- 188. Bushley KE, Ripoll DR, Turgeon BG. Module evolution and substrate specificity of fungal nonribosomal peptide synthetases involved in siderophore biosynthesis. BMC Evol Biol. 2008;8: 328. doi:10.1186/1471-2148-8-328
- 189. Weber T. In silico tools for the analysis of antibiotic biosynthetic pathways. Int J Med Microbiol. 2014;304: 230–235. doi:10.1016/j.ijmm.2014.02.001
- 190. Finking R, Marahiel MA. Biosynthesis of nonribosomal peptides. Annu Rev Microbiol. 2004;58: 453–488. doi:10.1146/annurev.micro.58.030603.123615
- 191. Leclère V, Weber T, Jacques P, Pupin M. Bioinformatics tools for the discovery of new nonribosomal peptides. Methods Mol Biol. 2016;1401: 209–232. doi:10.1007/978-1-4939-3375-4_14
- 192. Schwarzer D, Finking R, Marahiel MA. Nonribosomal peptides: from genes to products. Nat Prod Rep. 2003;20: 275–287. doi:10.1039/b111145k
- 193. Kasai S, Konno S, Ishikawa F, Kakeya H. Functional profiling of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases by competitive activity-based protein profiling. Chem Commun. 2015;51: 15764–15767. doi:10.1039/C5CC04953A
- 194. Conti E, Stachelhaus T, Marahiel MA, Brick P. Structural basis for the activation of phenylalanine in the nonribosomal biosynthesis of gramicidin S. EMBO J. 1997;16: 4174–4183. doi:10.1093/emboj/16.14.4174
- 195. May JJ, Kessler N, Marahiel MA, Stubbs MT. Crystal structure of DhbE, an archetype for aryl acid activating domains of modular nonribosomal peptide synthetases. Proc Natl Acad Sci USA. 2002;99: 12120–12125. doi:10.1073/pnas.182156699
- 196. Du L, He Y, Luo Y. Crystal structure and enantiomer selection by D-alanyl carrier protein ligase DltA from *Bacillus cereus*. Biochemistry. 2008;47: 11473–11480. doi:10.1021/bi801363b
- 197. Yonus H, Neumann P, Zimmermann S, May JJ, Marahiel MA, Stubbs MT. Crystal structure of DltA. Implications for the reaction mechanism of non-ribosomal peptide synthetase adenylation domains. J Biol Chem. 2008;283: 32484–32491. doi:10.1074/jbc.M800557200
- 198. Esmaeel Q, Chevalier M, Chataigné G, Subashkumar R, Jacques P, Leclère V. Nonribosomal peptide synthetase with a unique iterative-alternative-optional mechanism catalyzes amonabactin synthesis in *Aeromonas*. Appl Microbiol Biotechnol. 2016;100: 8453–8463. doi:10.1007/s00253-016-7773-4
- 199. Stachelhaus T, Mootz HD, Marahiel MA. The specificity-conferring code of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases. Chem Biol. 1999;6: 493–505. doi:10.1016/S1074-5521(99)80082-9

- Rausch C, Weber T, Kohlbacher O, Wohlleben W, Huson DH. Specificity prediction of adenylation domains in nonribosomal peptide synthetases (NRPS) using transductive support vector machines (TSVMs). Nucleic Acids Res. 2005;33: 5799–5808. doi:10.1093/nar/gki885
- 201. Walsh CT, Chen H, Keating TA, Hubbard BK, Losey HC, Luo L, et al. Tailoring enzymes that modify nonribosomal peptides during and after chain elongation on NRPS assembly lines. Curr Opin Chem Biol. 2001;5: 525–534. doi:10.1016/s1367-5931(00)00235-0
- 202. Belshaw PJ, Walsh CT, Stachelhaus T. Aminoacyl-CoAs as probes of condensation domain selectivity in nonribosomal peptide synthesis. Science. 1999;284: 486–489. doi:10.1126/science.284.5413.486
- 203. Ehmann DE, Trauger JW, Stachelhaus T, Walsh CT. Aminoacyl-SNACs as small-molecule substrates for the condensation domains of nonribosomal peptide synthetases. Chem Biol. 2000;7: 765–772. doi:10.1016/s1074-5521(00)00022-3
- 204. Linne U, Marahiel MA. Control of directionality in nonribosomal peptide synthesis: role of the condensation domain in preventing misinitiation and timing of epimerization. Biochemistry. 2000;39: 10439–10447. doi:10.1021/bi000768w
- 205. Luo L, Kohli RM, Onishi M, Linne U, Marahiel MA, Walsh CT. Timing of epimerization and condensation reactions in nonribosomal peptide assembly lines: kinetic analysis of phenylalanine activating elongation modules of tyrocidine synthetase B. Biochemistry. 2002;41: 9184–9196. doi:10.1021/bi026047+
- 206. Lautru S, Challis GL. Substrate recognition by nonribosomal peptide synthetase multi-enzymes. Microbiology. 2004;150: 1629–1636. doi:10.1099/mic.0.26837-0
- 207. Rausch C, Hoof I, Weber T, Wohlleben W, Huson DH. Phylogenetic analysis of condensation domains in NRPS sheds light on their functional evolution. BMC Evol Biol. 2007;7: 78. doi:10.1186/1471-2148-7-78
- De Crécy-Lagard V, Marlière P, Saurin W. Multienzymatic non ribosomal peptide biosynthesis: identification of the functional domains catalysing peptide elongation and epimerisation. C R Acad Sci III. 1995;318: 927–936.
- 209. Stachelhaus T, Mootz HD, Bergendahl V, Marahiel MA. Peptide bond formation in nonribosomal peptide biosynthesis. Catalytic role of the condensation domain. J Biol Chem. 1998;273: 22773–22781. doi:10.1074/jbc.273.35.22773
- 210. Bloudoff K, Schmeing TM. Structural and functional aspects of the nonribosomal peptide synthetase condensation domain superfamily: discovery, dissection and diversity. Biochim Biophys Acta Proteins Proteom. 2017;1865: 1587–1604. doi:10.1016/j.bbapap.2017.05.010
- 211. Gao X, Haynes SW, Ames BD, Wang P, Vien LP, Walsh CT, et al. Cyclization of fungal nonribosomal peptides by a terminal condensation-like domain. Nat Chem Biol. 2012;8: 823–830. doi:10.1038/nchembio.1047
- 212. Sieber SA, Marahiel MA. Learning from nature's drug factories: nonribosomal synthesis of macrocyclic peptides. J Bacteriol. 2003;185: 7036–7043. doi:10.1128/jb.185.24.7036-7043.2003
- 213. Kawai Y, Ishii Y, Arakawa K, Uemura K, Saitoh B, Nishimura J, et al. Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. Appl Environ Microbiol. 2004;70: 2906–2911. doi:10.1128/aem.70.5.2906-2911.2004
- 214. Konz D, Klens A, Schörgendorfer K, Marahiel MA. The bacitracin biosynthesis operon of *Bacillus licheniformis* ATCC 10716: molecular characterization of three multi-modular peptide synthetases. Chem Biol. 1997;4: 927–937. doi:10.1016/s1074-5521(97)90301-x
- 215. Shen B, Du L, Sanchez C, Edwards DJ, Chen M, Murrell JM. The biosynthetic gene cluster for the anticancer drug bleomycin from *Streptomyces verticillus* ATCC15003 as a model for hybrid peptide-polyketide natural product biosynthesis. J Ind Microbiol Biotechnol. 2001;27: 378–385. doi:10.1038/sj.jim.7000194

- 216. Gehring AM, Mori I, Perry RD, Walsh CT. The nonribosomal peptide synthetase HMWP2 forms a thiazoline ring during biogenesis of yersiniabactin, an iron-chelating virulence factor of *Yersinia pestis*. Biochemistry. 1998;37: 11637–11650. doi:10.1021/bi9812571
- 217. Du L, Chen M, Sánchez C, Shen B. An oxidation domain in the BlmIII non-ribosomal peptide synthetase probably catalyzing thiazole formation in the biosynthesis of the anti-tumor drug bleomycin in *Streptomyces verticillus* ATCC15003. FEMS Microbiol Lett. 2000;189: 171–175. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb09225.x
- 218. Schneider TL, Shen B, Walsh CT. Oxidase domains in epothilone and bleomycin biosynthesis: thiazoline to thiazole oxidation during chain elongation. Biochemistry. 2003;42: 9722–9730. doi:10.1021/bi034792w
- 219. Manavalan B, Murugapiran SK, Lee G, Choi S. Molecular modeling of the reductase domain to elucidate the reaction mechanism of reduction of peptidyl thioester into its corresponding alcohol in non-ribosomal peptide synthetases. BMC Struct Biol. 2010;10: 1. doi:10.1186/1472-6807-10-1
- 220. McErlean M, Overbay J, Van Lanen S. Refining and expanding nonribosomal peptide synthetase function and mechanism. J Ind Microbiol Biotechnol. 2019;46: 493–513. doi:10.1007/s10295-018-02130-w
- 221. Schoenafinger G, Schracke N, Linne U, Marahiel MA. Formylation domain: an essential modifying enzyme for the nonribosomal biosynthesis of linear gramicidin. J Am Chem Soc. 2006;128: 7406–7407. doi:10.1021/ja0611240
- 222. Reimer JM, Haque AS, Tarry MJ, Schmeing TM. Piecing together nonribosomal peptide synthesis. Curr Opin Struct Biol. 2018;49: 104–113. doi:10.1016/j.sbi.2018.01.011
- 223. Mootz HD, Schwarzer D, Marahiel MA. Ways of assembling complex natural products on modular nonribosomal peptide synthetases. Chembiochem. 2002;3: 490–504. doi:10.1002/1439-7633(20020603)3:6<490::AID-CBIC490>3.0.CO;2-N
- 224. Schwecke T, Göttling K, Durek P, Dueñas I, Käufer NF, Zock-Emmenthal S, et al. Nonribosomal peptide synthesis in *Schizosaccharomyces pombe* and the architectures of ferrichrome-type siderophore synthetases in fungi. Chembiochem. 2006;7: 612–622. doi:10.1002/cbic.200500301
- 225. Barghouthi S, Young R, Olson MO, Arceneaux JE, Clem LW, Byers BR. Amonabactin, a novel tryptophan- or phenylalanine-containing phenolate siderophore in *Aeromonas hydrophila*. J Bacteriol. 1989;171: 1811– 1816. doi:10.1128/jb.171.4.1811-1816.1989
- 226. von Döhren H, Keller U, Vater J, Zocher R. Multifunctional Peptide Synthetases. Chem Rev. 1997;97: 2675–2706. doi:10.1021/cr9600262
- 227. Caboche S, Leclère V, Pupin M, Kucherov G, Jacques P. Diversity of monomers in nonribosomal peptides: towards the prediction of origin and biological activity. J Bacteriol. 2010;192: 5143–5150. doi:10.1128/JB.00315-10
- 228. Haas H. Fungal siderophore metabolism with a focus on *Aspergillus fumigatus*. Nat Prod Rep. 2014;31: 1266–1276. doi:10.1039/c4np00071d
- 229. van Wageningen AM, Kirkpatrick PN, Williams DH, Harris BR, Kershaw JK, Lennard NJ, et al. Sequencing and analysis of genes involved in the biosynthesis of a vancomycin group antibiotic. Chem Biol. 1998;5: 155–162. doi:10.1016/s1074-5521(98)90060-6
- 230. Staunton J, Wilkinson B. Biosynthesis of erythromycin and rapamycin. Chem Rev. 1997;97: 2611–2630. doi:10.1021/cr9600316
- 231. Wenzel M, Rautenbach M, Vosloo JA, Siersma T, Aisenbrey CHM, Zaitseva E, et al. The multifaceted antibacterial mechanisms of the pioneering peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin S. mBio. 2018;9. doi:10.1128/mBio.00802-18

- 232. Müller WH, van der Krift TP, Krouwer AJ, Wösten HA, van der Voort LH, Smaal EB, et al. Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. EMBO J. 1991;10: 489–495.
- 233. Liu C, Bayer A, Cosgrove SE, Daum RS, Fridkin SK, Gorwitz RJ, et al. Clinical practice guidelines by the infectious diseases society of america for the treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* infections in adults and children. Clin Infect Dis. 2011;52: e18-55. doi:10.1093/cid/ciq146
- 234. Houwaart S, Youssar L, Hüttel W. Pneumocandin biosynthesis: involvement of a trans-selective proline hydroxylase. Chembiochem. 2014;15: 2365–2369. doi:10.1002/cbic.201402175
- 235. Ramachandran R, Shrivastava M, Narayanan NN, Thakur RL, Chakrabarti A, Roy U. Evaluation of antifungal efficacy of three new cyclic lipopeptides of the class bacillomycin from *Bacillus subtilis* RLID 12.1. Antimicrob Agents Chemother. 2018;62. doi:10.1128/AAC.01457-17
- 236. Szekeres A, Leitgeb B, Kredics L, Antal Z, Hatvani L, Manczinger L, et al. Peptaibols and related peptaibiotics of *Trichoderma*. A review. Acta Microbiol Immunol Hung. 2005;52: 137–168. doi:10.1556/AMicr.52.2005.2.2
- 237. Scharf DH, Brakhage AA, Mukherjee PK. Gliotoxin--bane or boon? Environ Microbiol. 2016;18: 1096–1109. doi:10.1111/1462-2920.13080
- 238. Marik T, Tyagi C, Balázs D, Urbán P, Szepesi Á, Bakacsy L, et al. Structural diversity and bioactivities of peptaibol compounds from the longibrachiatum clade of the filamentous fungal genus *Trichoderma*. Front Microbiol. 2019;10: 1434. doi:10.3389/fmicb.2019.01434
- 239. Férir G, Hänchen A, François KO, Hoorelbeke B, Huskens D, Dettner F, et al. Feglymycin, a unique natural bacterial antibiotic peptide, inhibits HIV entry by targeting the viral envelope protein gp120. Virology. 2012;433: 308–319. doi:10.1016/j.virol.2012.08.007
- 240. Bösch NM, Borsa M, Greczmiel U, Morinaka BI, Gugger M, Oxenius A, et al. Landornamides: antiviral ornithine-containing ribosomal peptides discovered through genome mining. Angew Chem Int Ed Engl. 2020. doi:10.1002/anie.201916321
- 241. Greer B, Meneely JP, Elliott CT. Uptake and accumulation of microcystin-LR based on exposure through drinking water: an animal model assessing the human health risk. Sci Rep. 2018;8: 4913. doi:10.1038/s41598-018-23312-7
- 242. Foss AJ, Aubel MT, Gallagher B, Mettee N, Miller A, Fogelson SB. Diagnosing microcystin intoxication of canines: clinicopathological indications, pathological characteristics, and analytical detection in postmortem and antemortem samples. Toxins (Basel). 2019;11. doi:10.3390/toxins11080456
- 243. Gautier C, Pinson-Gadais L, Richard-Forget F. *Fusarium* mycotoxins enniatins: an updated review of their occurrence, the producing *Fusarium* species, and the abiotic determinants of their accumulation in crop harvests. J Agric Food Chem. 2020;68: 4788–4798. doi:10.1021/acs.jafc.0c00411
- 244. Rajarammohan S, Paritosh K, Pental D, Kaur J. Comparative genomics of *Alternaria* species provides insights into the pathogenic lifestyle of *Alternaria brassicae* a pathogen of the Brassicaceae family. BMC Genomics. 2019;20: 1036. doi:10.1186/s12864-019-6414-6
- 245. Gardiner DM, Cozijnsen AJ, Wilson LM, Pedras MSC, Howlett BJ. The sirodesmin biosynthetic gene cluster of the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. Mol Microbiol. 2004;53: 1307–1318. doi:10.1111/j.1365-2958.2004.04215.x
- 246. Liu H, Xie L, Wang J, Guo Q, Yang S, Liang P, et al. The stress-responsive and host-oriented role of nonribosomal peptide synthetases in an entomopathogenic fungus, *Beauveria bassiana*. J Microbiol Biotechnol. 2017;27: 439–449. doi:10.4014/jmb.1606.06056
- 247. Aşcı Çelik D, Gurbuz N, Toğay VA, Özçelik N. Ochratoxin A causes cell cycle arrest in G1 and G1/S phases through p53 in HK-2 cells. Toxicon. 2020;180: 11–17. doi:10.1016/j.toxicon.2020.03.012

- 248. Jahan R, Bodratti AM, Tsianou M, Alexandridis P. Biosurfactants, natural alternatives to synthetic surfactants: physicochemical properties and applications. Adv Colloid Interface Sci. 2020;275: 102061. doi:10.1016/j.cis.2019.102061
- 249. Sarwar A, Brader G, Corretto E, Aleti G, Abaidullah M, Sessitsch A, et al. Qualitative analysis of biosurfactants from *Bacillus* species exhibiting antifungal activity. PLoS One. 2018;13. doi:10.1371/journal.pone.0198107
- 250. Dreyfuss M, Härri E, Hofmann H, Kobel H, Pache W, Tscherter H. Cyclosporin A and C. European J Appl Microbiol. 1976;3: 125–133. doi:10.1007/BF00928431
- 251. Schneider BA, Balskus EP. Discovery of small molecule protease inhibitors by investigating a widespread human gut bacterial biosynthetic pathway. Tetrahedron. 2018;74: 3215–3230. doi:10.1016/j.tet.2018.03.043
- 252. Haas H. Molecular genetics of fungal siderophore biosynthesis and uptake: the role of siderophores in iron uptake and storage. Appl Microbiol Biotechnol. 2003;62: 316–330. doi:10.1007/s00253-003-1335-2
- 253. Frey PA, Reed GH. The ubiquity of iron. ACS Chem Biol. 2012;7: 1477-1481. doi:10.1021/cb300323q
- 254. Stehling O, Lill R. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2013;5. doi:10.1101/cshperspect.a011312
- 255. Torrents E, Aloy P, Gibert I, Rodríguez-Trelles F. Ribonucleotide reductases: divergent evolution of an ancient enzyme. J Mol Evol. 2002;55: 138–152. doi:10.1007/s00239-002-2311-7
- 256. Bruyneel B, vande Woestyne M, Verstraete W. Lactic acid bacteria: micro-organisms able to grow in the absence of available iron and copper. Biotechnol Lett. 1989;11: 401–406. doi:10.1007/BF01089472
- 257. Posey JE, Gherardini FC. Lack of a role for iron in the Lyme disease pathogen. Science. 2000;288: 1651– 1653. doi:10.1126/science.288.5471.1651
- 258. Raymond KN, Tufano TP. Coordination chemistry of the siderophores and recent studies of synthetic analogs. 1982; pp. 85-105. In: Dunford HB, Dolphin D, Raymond KN, and Sieker L (eds.), The biological chemistry of iron. Reidel D Publishing Co., Dordrecht, Holland.
- 259. Miethke M, Marahiel MA. Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. Microbiol Mol Biol Rev. 2007;71: 413–451. doi:10.1128/MMBR.00012-07
- 260. Loutet SA, Chan ACK, Kobylarz MJ, Verstraete MM, Pfaffen S, Ye B, Arrieta AL, Murphy MEP. The fate of intracellular metal ions in microbes. 2015; pp. 39-56. In: Skaar EP, Nriagu JO (Eds.), Trace metals and infectious disease, MIT Press.
- 261. Kronstad JW, Hu G, Jung WH. An encapsulation of iron homeostasis and virulence in *Cryptococcus neoformans*. Trends Microbiol. 2013;21: 457–465. doi:10.1016/j.tim.2013.05.007
- 262. Zhang X, Zhang D, Sun W, Wang T. The adaptive mechanism of plants to iron deficiency via iron uptake, transport, and homeostasis. Int J Mol Sci. 2019;20. doi:10.3390/ijms20102424
- 263. Wilson BR, Bogdan AR, Miyazawa M, Hashimoto K, Tsuji Y. Siderophores in iron metabolism: from mechanism to therapy potential. Trends Mol Med. 2016;22: 1077–1090. doi:10.1016/j.molmed.2016.10.005
- 264. Hider RC, Kong X. Chemistry and biology of siderophores. Nat Prod Rep. 2010;27: 637–657. doi:10.1039/b906679a
- 265. Boukhalfa H, Crumbliss AL. Chemical aspects of siderophore mediated iron transport. Biometals. 2002;15: 325–339. doi:10.1023/a:1020218608266

- 266. Evans RW, Kong X, Hider RC. Iron mobilization from transferrin by therapeutic iron chelating agents. Biochim Biophys Acta. 2012;1820: 282–290. doi:10.1016/j.bbagen.2011.11.007
- 267. Carroll CS, Grieve CL, Murugathasan I, Bennet AJ, Czekster CM, Liu H, et al. The rhizoferrin biosynthetic gene in the fungal pathogen *Rhizopus delemar* is a novel member of the NIS gene family. Int J Biochem Cell Biol. 2017;89: 136–146. doi:10.1016/j.biocel.2017.06.005
- 268. Sørensen JL, Knudsen M, Hansen FT, Olesen C, Fuertes PR, Lee TV, et al. Fungal NRPS-dependent siderophores: from function to prediction. In: Martín J-F, García-Estrada C, Zeilinger S, editors. Biosynthesis and Molecular Genetics of Fungal Secondary Metabolites. New York, NY: Springer; 2014. pp. 317–339. doi:10.1007/978-1-4939-1191-2_15
- 269. Schrettl M, Kim HS, Eisendle M, Kragl C, Nierman WC, Heinekamp T, et al. SreA-mediated iron regulation in *Aspergillus fumigatus*. Mol Microbiol. 2008;70: 27–43. doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06376.x
- 270. Franken ACW, Lechner BE, Werner ER, Haas H, Lokman BC, Ram AFJ, et al. Genome mining and functional genomics for siderophore production in *Aspergillus niger*. Brief Funct Genomics. 2014;13: 482–492. doi:10.1093/bfgp/elu026
- 271. Heymann P, Gerads M, Schaller M, Dromer F, Winkelmann G, Ernst JF. The siderophore iron transporter of *Candida albicans* (Sit1p/Arn1p) mediates uptake of ferrichrome-type siderophores and is required for epithelial invasion. Infect Immun. 2002;70: 5246–5255. doi:10.1128/iai.70.9.5246-5255.2002
- 272. Philpott CC. Iron uptake in fungi: a system for every source. Biochim Biophys Acta. 2006;1763: 636–645. doi:10.1016/j.bbamcr.2006.05.008
- 273. Kragl C, Schrettl M, Abt B, Sarg B, Lindner HH, Haas H. EstB-mediated hydrolysis of the siderophore triacetylfusarinine C optimizes iron uptake of *Aspergillus fumigatus*. Eukaryotic Cell. 2007;6: 1278–1285. doi:10.1128/EC.00066-07
- 274. Gründlinger M, Gsaller F, Schrettl M, Lindner H, Haas H. Aspergillus fumigatus SidJ mediates intracellular siderophore hydrolysis. Appl Environ Microbiol. 2013;79: 7534–7536. doi:10.1128/AEM.01285-13
- 275. Bairwa G, Jung WH, Kronstad JW. Iron acquisition in fungal pathogens of humans. Metallomics. 2017;9: 215–227. doi:10.1039/c6mt00301j
- 276. Yun CW, Bauler M, Moore RE, Klebba PE, Philpott CC. The role of the FRE family of plasma membrane reductases in the uptake of siderophore-iron in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2001;276: 10218– 10223. doi:10.1074/jbc.M010065200
- 277. Kosman DJ. Molecular mechanisms of iron uptake in fungi. Mol Microbiol. 2003;47: 1185–1197. doi:10.1046/j.1365-2958.2003.03368.x
- 278. Stearman R, Yuan DS, Yamaguchi-Iwai Y, Klausner RD, Dancis A. A permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast. Science. 1996;271: 1552–1557. doi:10.1126/science.271.5255.1552
- 279. Wang T-P, Quintanar L, Severance S, Solomon EI, Kosman DJ. Targeted suppression of the ferroxidase and iron trafficking activities of the multicopper oxidase Fet3p from *Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Inorg Chem. 2003;8: 611–620. doi:10.1007/s00775-003-0456-5
- 280. Culotta VC, Yang M, Hall MD. Manganese transport and trafficking: lessons learned from *Saccharomyces cerevisiae*. Eukaryotic Cell. 2005;4: 1159–1165. doi:10.1128/EC.4.7.1159-1165.2005
- 281. Hassett RF, Romeo AM, Kosman DJ. Regulation of high affinity iron uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Role of dioxygen and Fe. J Biol Chem. 1998;273: 7628–7636. doi:10.1074/jbc.273.13.7628
- 282. Jensen LT, Culotta VC. Regulation of *Saccharomyces cerevisiae FET4* by oxygen and iron. J Mol Biol. 2002;318: 251–260. doi:10.1016/S0022-2836(02)00093-1

- 283. Santos R, Buisson N, Knight S, Dancis A, Camadro J-M, Lesuisse E. Haemin uptake and use as an iron source by *Candida albicans*: role of CaHMX1-encoded haem oxygenase. Microbiology. 2003;149: 579–588. doi:10.1099/mic.0.26108-0
- 284. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*. Infect Immun. 1994;62: 5154–5156. doi:10.1128/IAI.62.11.5154-5156.1994
- 285. Pendrak ML, Krutzsch HC, Roberts DD. Structural requirements for hemoglobin to induce fibronectin receptor expression in *Candida albicans*. Biochemistry. 2000;39: 16110–16118. doi:10.1021/bi0012585
- 286. De Groot PWJ, Hellingwerf KJ, Klis FM. Genome-wide identification of fungal GPI proteins. Yeast. 2003;20: 781–796. doi:10.1002/yea.1007
- 287. Kuznets G, Vigonsky E, Weissman Z, Lalli D, Gildor T, Kauffman SJ, et al. A relay network of extracellular heme-binding proteins drives *C. albicans* iron acquisition from hemoglobin. PLoS Pathog. 2014;10: e1004407. doi:10.1371/journal.ppat.1004407
- 288. Okamoto-Shibayama K, Kikuchi Y, Kokubu E, Sato Y, Ishihara K. Csa2, a member of the Rbt5 protein family, is involved in the utilization of iron from human hemoglobin during *Candida albicans* hyphal growth. FEMS Yeast Res. 2014;14: 674–677. doi:10.1111/1567-1364.12160
- 289. Nasser L, Weissman Z, Pinsky M, Amartely H, Dvir H, Kornitzer D. Structural basis of haem-iron acquisition by fungal pathogens. Nat Microbiol. 2016;1: 16156. doi:10.1038/nmicrobiol.2016.156
- 290. Pinsky M, Roy U, Moshe S, Weissman Z, Kornitzer D. Human serum albumin facilitates heme-iron utilization by fungi. mBio. 2020;11. doi:10.1128/mBio.00607-20
- 291. Defosse TA, Le Govic Y, Courdavault V, Clastre M, Vandeputte P, Chabasse D, et al. [Yeasts from the CTG clade (*Candida* clade): Biology, impact in human health, and biotechnological applications]. J Mycol Med. 2018;28: 257–268. doi:10.1016/j.mycmed.2018.02.009
- 292. Foster L-AA. Utilization and cell-surface binding of hemin by *Histoplasma capsulatum*. Can J Microbiol. 2002;48: 437–442. doi:10.1139/w02-037
- 293. Hu G, Caza M, Cadieux B, Chan V, Liu V, Kronstad J. Cryptococcus neoformans requires the ESCRT protein Vps23 for iron acquisition from heme, for capsule formation, and for virulence. Infect Immun. 2013;81: 292–302. doi:10.1128/IAI.01037-12
- 294. Cadieux B, Lian T, Hu G, Wang J, Biondo C, Teti G, et al. The Mannoprotein Cig1 supports iron acquisition from heme and virulence in the pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. J Infect Dis. 2013;207: 1339–1347. doi:10.1093/infdis/jit029
- 295. Bailão EFLC, Parente JA, Pigosso LL, de Castro KP, Fonseca FL, Silva-Bailão MG, et al. Hemoglobin uptake by *Paracoccidioides* spp. is receptor-mediated. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8: e2856. doi:10.1371/journal.pntd.0002856
- 296. Haas H. Iron a key nexus in the virulence of *Aspergillus fumigatus*. Front Microbiol. 2012;3: 28. doi:10.3389/fmicb.2012.00028
- 297. Vaknin Y, Shadkchan Y, Levdansky E, Morozov M, Romano J, Osherov N. The three Aspergillus fumigatus CFEM-domain GPI-anchored proteins (CfmA-C) affect cell-wall stability but do not play a role in fungal virulence. Fungal Genet Biol. 2014;63: 55–64. doi:10.1016/j.fgb.2013.12.005
- 298. Eisendle M, Schrettl M, Kragl C, Müller D, Illmer P, Haas H. The intracellular siderophore ferricrocin is involved in iron storage, oxidative-stress resistance, germination, and sexual development in *Aspergillus nidulans*. Eukaryotic Cell. 2006;5: 1596–1603. doi:10.1128/EC.00057-06
- 299. Schrettl M, Bignell E, Kragl C, Sabiha Y, Loss O, Eisendle M, et al. Distinct roles for intra- and extracellular siderophores during *Aspergillus fumigatus* infection. PLoS Pathog. 2007;3: 1195–1207. doi:10.1371/journal.ppat.0030128

- 300. Wallner A, Blatzer M, Schrettl M, Sarg B, Lindner H, Haas H. Ferricrocin, a siderophore involved in intraand transcellular iron distribution in *Aspergillus fumigatus*. Appl Environ Microbiol. 2009;75: 4194–4196. doi:10.1128/AEM.00479-09
- 301. Horowitz NH, Charlang G, Horn G, Williams NP. Isolation and identification of the conidial germination factor of *Neurospora crassa*. J Bacteriol. 1976;127: 135–140. doi:10.1128/JB.127.1.135-140.1976
- 302. Charlang G, Ng B, Horowitz NH, Horowitz RM. Cellular and extracellular siderophores of *Aspergillus nidulans* and *Penicillium chrysogenum*. Mol Cell Biol. 1981;1: 94–100. doi:10.1128/mcb.1.2.94
- 303. Oide S, Moeder W, Krasnoff S, Gibson D, Haas H, Yoshioka K, et al. NPS6, encoding a nonribosomal peptide synthetase involved in siderophore-mediated iron metabolism, is a conserved virulence determinant of plant pathogenic ascomycetes. Plant Cell. 2006;18: 2836–2853. doi:10.1105/tpc.106.045633
- 304. Nguyen TQ, Dziuba N, Lindahl PA. Isolated *Saccharomyces cerevisiae* vacuoles contain low-molecular-mass transition-metal polyphosphate complexes. Metallomics. 2019;11: 1298–1309. doi:10.1039/C9MT00104B
- 305. Martins TS, Costa V, Pereira C. Signaling pathways governing iron homeostasis in budding yeast. Mol Microbiol. 2018;109: 422–432. doi:10.1111/mmi.14009
- 306. Haas H, Eisendle M, Turgeon BG. Siderophores in fungal physiology and virulence. Annu Rev Phytopathol. 2008;46: 149–187. doi:10.1146/annurev.phyto.45.062806.094338
- 307. Haas H, Zadra I, Stöffler G, Angermayr K. The Aspergillus nidulans GATA factor SREA is involved in regulation of siderophore biosynthesis and control of iron uptake. J Biol Chem. 1999;274: 4613–4619. doi:10.1074/jbc.274.8.4613
- 308. Hortschansky P, Eisendle M, Al-Abdallah Q, Schmidt AD, Bergmann S, Thön M, et al. Interaction of HapX with the CCAAT-binding complex—a novel mechanism of gene regulation by iron. EMBO J. 2007;26: 3157–3168. doi:10.1038/sj.emboj.7601752
- 309. Schrettl M, Beckmann N, Varga J, Heinekamp T, Jacobsen ID, Jöchl C, et al. HapX-mediated adaption to iron starvation is crucial for virulence of *Aspergillus fumigatus*. PLoS Pathog. 2010;6: e1001124. doi:10.1371/journal.ppat.1001124
- 310. Hsu P-C, Yang C-Y, Lan C-Y. *Candida albicans* Hap43 is a repressor induced under low-iron conditions and is essential for iron-responsive transcriptional regulation and virulence. Eukaryotic Cell. 2011;10: 207–225. doi:10.1128/EC.00158-10
- 311. Jung WH, Saikia S, Hu G, Wang J, Fung CK-Y, D'Souza C, et al. HapX positively and negatively regulates the transcriptional response to iron deprivation in *Cryptococcus neoformans*. PLoS Pathog. 2010;6: e1001209. doi:10.1371/journal.ppat.1001209
- 312. Chen C, Pande K, French SD, Tuch BB, Noble SM. An iron homeostasis regulatory circuit with reciprocal roles in *Candida albicans* commensalism and pathogenesis. Cell Host Microbe. 2011;10: 118–135. doi:10.1016/j.chom.2011.07.005
- 313. Kaplan CD, Kaplan J. Iron acquisition and transcriptional regulation. Chem Rev. 2009;109: 4536–4552. doi:10.1021/cr9001676
- 314. Vödisch M, Albrecht D, Lessing F, Schmidt AD, Winkler R, Guthke R, et al. Two-dimensional proteome reference maps for the human pathogenic filamentous fungus *Aspergillus fumigatus*. Proteomics. 2009;9: 1407–1415. doi:10.1002/pmic.200800394
- 315. Willger SD, Puttikamonkul S, Kim K-H, Burritt JB, Grahl N, Metzler LJ, et al. A sterol-regulatory element binding protein is required for cell polarity, hypoxia adaptation, azole drug resistance, and virulence in Aspergillus fumigatus. PLoS Pathog. 2008;4: e1000200. doi:10.1371/journal.ppat.1000200

- 316. Blatzer M, Barker BM, Willger SD, Beckmann N, Blosser SJ, Cornish EJ, et al. SREBP coordinates iron and ergosterol homeostasis to mediate triazole drug and hypoxia responses in the human fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. PLoS Genet. 2011;7: e1002374. doi:10.1371/journal.pgen.1002374
- 317. Hissen AHT, Wan ANC, Warwas ML, Pinto LJ, Moore MM. The Aspergillus fumigatus siderophore biosynthetic gene sidA, encoding L-ornithine N5-oxygenase, is required for virulence. Infect Immun. 2005;73: 5493– 5503. doi:10.1128/IAI.73.9.5493-5503.2005
- 318. Yasmin S, Alcazar-Fuoli L, Gründlinger M, Puempel T, Cairns T, Blatzer M, et al. Mevalonate governs interdependency of ergosterol and siderophore biosyntheses in the fungal pathogen *Aspergillus fumigatus*. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109: E497-504. doi:10.1073/pnas.1106399108
- 319. McDonagh A, Fedorova ND, Crabtree J, Yu Y, Kim S, Chen D, et al. Sub-telomere directed gene expression during initiation of invasive aspergillosis. PLoS Pathog. 2008;4: e1000154. doi:10.1371/journal.ppat.1000154
- 320. Hissen AHT, Moore MM. Site-specific rate constants for iron acquisition from transferrin by the Aspergillus fumigatus siderophores N',N",N"'-triacetylfusarinine C and ferricrocin. J Biol Inorg Chem. 2005;10: 211–220. doi:10.1007/s00775-005-0630-z
- 321. Schrettl M, Ibrahim-Granet O, Droin S, Huerre M, Latgé J-P, Haas H. The crucial role of the *Aspergillus fumigatus* siderophore system in interaction with alveolar macrophages. Microbes Infect. 2010;12: 1035–1041. doi:10.1016/j.micinf.2010.07.005
- 322. Seifert M, Nairz M, Schroll A, Schrettl M, Haas H, Weiss G. Effects of the *Aspergillus fumigatus* siderophore systems on the regulation of macrophage immune effector pathways and iron homeostasis. Immunobiology. 2008;213: 767–778. doi:10.1016/j.imbio.2008.07.010
- 323. Oosthuizen JL, Gomez P, Ruan J, Hackett TL, Moore MM, Knight DA, et al. Dual organism transcriptomics of airway epithelial cells interacting with conidia of *Aspergillus fumigatus*. PLoS One. 2011;6: e20527. doi:10.1371/journal.pone.0020527
- 324. Hwang LH, Mayfield JA, Rine J, Sil A. *Histoplasma* requires *SID1*, a member of an iron-regulated siderophore gene cluster, for host colonization. PLoS Pathog. 2008;4: e1000044. doi:10.1371/journal.ppat.1000044
- 325. Horbach R, Graf A, Weihmann F, Antelo L, Mathea S, Liermann JC, et al. Sfp-type 4'-phosphopantetheinyl transferase is indispensable for fungal pathogenicity. Plant Cell. 2009;21: 3379–3396. doi:10.1105/tpc.108.064188
- 326. Moree WJ, Phelan VV, Wu C-H, Bandeira N, Cornett DS, Duggan BM, et al. Interkingdom metabolic transformations captured by microbial imaging mass spectrometry. Proc Natl Acad Sci USA. 2012;109: 13811–13816. doi:10.1073/pnas.1206855109
- 327. Sass G, Nazik H, Penner J, Shah H, Ansari SR, Clemons KV, et al. Studies of *Pseudomonas aeruginosa* mutants indicate pyoverdine as the central factor in inhibition of *Aspergillus fumigatus* biofilm. J Bacteriol. 2018;200. doi:10.1128/JB.00345-17
- 328. Jung WH, Sham A, Lian T, Singh A, Kosman DJ, Kronstad JW. Iron source preference and regulation of iron uptake in *Cryptococcus neoformans*. PLoS Pathog. 2008;4: e45. doi:10.1371/journal.ppat.0040045
- 329. Ramanan N, Wang Y. A high-affinity iron permease essential for *Candida albicans* virulence. Science. 2000;288: 1062–1064. doi:10.1126/science.288.5468.1062
- 330. Drevinek P, Holden MTG, Ge Z, Jones AM, Ketchell I, Gill RT, et al. Gene expression changes linked to antimicrobial resistance, oxidative stress, iron depletion and retained motility are observed when *Burkholderia cenocepacia* grows in cystic fibrosis sputum. BMC Infect Dis. 2008;8: 121. doi:10.1186/1471-2334-8-121

- 331. Stites SW, Walters B, O'Brien-Ladner AR, Bailey K, Wesselius LJ. Increased iron and ferritin content of sputum from patients with cystic fibrosis or chronic bronchitis. Chest. 1998;114: 814–819. doi:10.1378/chest.114.3.814
- 332. Reid DW, Withers NJ, Francis L, Wilson JW, Kotsimbos TC. Iron deficiency in cystic fibrosis: relationship to lung disease severity and chronic *Pseudomonas aeruginosa* infection. Chest. 2002;121: 48–54. doi:10.1378/chest.121.1.48
- 333. Reid DW, Lam QT, Schneider H, Walters EH. Airway iron and iron-regulatory cytokines in cystic fibrosis. Eur Respir J. 2004;24: 286–291. doi:10.1183/09031936.04.00104803
- 334. Hunter RC, Asfour F, Dingemans J, Osuna BL, Samad T, Malfroot A, et al. Ferrous iron is a significant component of bioavailable iron in cystic fibrosis airways. mBio. 2013;4. doi:10.1128/mBio.00557-13
- 335. Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath K, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. Proc Natl Acad Sci USA. 1993;90: 9285–9289. doi:10.1073/pnas.90.20.9285
- 336. Cosgrove S, Chotirmall SH, Greene CM, McElvaney NG. Pulmonary proteases in the cystic fibrosis lung induce interleukin 8 expression from bronchial epithelial cells via a heme/meprin/epidermal growth factor receptor/Toll-like receptor pathway. J Biol Chem. 2011;286: 7692–7704. doi:10.1074/jbc.M110.183863
- 337. Reid DW, Anderson GJ, Lamont IL. Role of lung iron in determining the bacterial and host struggle in cystic fibrosis. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol. 2009;297: L795-802. doi:10.1152/ajplung.00132.2009
- 338. Reid DW, Carroll V, O'May C, Champion A, Kirov SM. Increased airway iron as a potential factor in the persistence of *Pseudomonas aeruginosa* infection in cystic fibrosis. Eur Respir J. 2007;30: 286–292. doi:10.1183/09031936.00154006
- 339. Petrik M, Pfister J, Misslinger M, Decristoforo C, Haas H. Siderophore-based molecular imaging of fungal and bacterial infections-current status and future perspectives. J Fungi (Basel). 2020;6. doi:10.3390/jof6020073
- 340. Eigl S, Prattes J, Reinwald M, Thornton CR, Reischies F, Spiess B, et al. Influence of mould-active antifungal treatment on the performance of the *Aspergillus*-specific bronchoalveolar lavage fluid lateral-flow device test. Int J Antimicrob Agents. 2015;46: 401–405. doi:10.1016/j.ijantimicag.2015.05.017
- 341. Prattes J, Lackner M, Eigl S, Reischies F, Raggam RB, Koidl C, et al. Diagnostic accuracy of the Aspergillusspecific bronchoalveolar lavage lateral-flow assay in haematological malignancy patients. Mycoses. 2015;58: 461–469. doi:10.1111/myc.12343
- 342. Carroll CS, Amankwa LN, Pinto LJ, Fuller JD, Moore MM. Detection of a serum siderophore by LC-MS/MS as a potential biomarker of invasive aspergillosis. PLoS One. 2016;11: e0151260. doi:10.1371/journal.pone.0151260
- 343. Orasch T, Prattes J, Faserl K, Eigl S, Düttmann W, Lindner H, et al. Bronchoalveolar lavage triacetylfusarinine C (TAFC) determination for diagnosis of invasive pulmonary aspergillosis in patients with hematological malignancies. J Infect. 2017;75: 370–373. doi:10.1016/j.jinf.2017.05.014
- 344. Hoenigl M, Orasch T, Faserl K, Prattes J, Loeffler J, Springer J, et al. Triacetylfusarinine C: a urine biomarker for diagnosis of invasive aspergillosis. J Infect. 2019;78: 150–157. doi:10.1016/j.jinf.2018.09.006
- 345. Petrik M, Haas H, Laverman P, Schrettl M, Franssen GM, Blatzer M, et al. ⁶⁸Ga-triacetylfusarinine C and ⁶⁸Ga-ferrioxamine E for Aspergillus infection imaging: uptake specificity in various microorganisms. Mol Imaging Biol. 2014;16: 102–108. doi:10.1007/s11307-013-0654-7
- 346. Petrik M, Vlckova A, Novy Z, Urbanek L, Haas H, Decristoforo C. Selected ⁶⁸Ga-siderophores versus ⁶⁸Ga-colloid and ⁶⁸Ga-citrate: biodistribution and small animal imaging in mice. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2015;159: 60–66. doi:10.5507/bp.2014.052

- 347. Bertrand S, Bouchara J-P, Venier M-C, Richomme P, Duval O, Larcher G. N(α)-methyl coprogen B, a potential marker of the airway colonization by *Scedosporium apiospermum* in patients with cystic fibrosis. Med Mycol. 2010;48 Suppl 1: S98–107. doi:10.3109/13693786.2010.503972
- 348. Petrik M, Haas H, Dobrozemsky G, Lass-Flörl C, Helbok A, Blatzer M, et al. ⁶⁸Ga-siderophores for PET imaging of invasive pulmonary aspergillosis: proof of principle. J Nucl Med. 2010;51: 639–645. doi:10.2967/jnumed.109.072462
- 349. Luptáková D, Pluháček T, Petřík M, Novák J, Palyzová A, Sokolová L, et al. Non-invasive and invasive diagnoses of aspergillosis in a rat model by mass spectrometry. Sci Rep. 2017;7. doi:10.1038/s41598-017-16648-z
- 350. Franceschini S, Fedkenheuer M, Vogelaar NJ, Robinson HH, Sobrado P, Mattevi A. Structural insight into the mechanism of oxygen activation and substrate selectivity of flavin-dependent N-hydroxylating monooxygenases. Biochemistry. 2012;51: 7043–7045. doi:10.1021/bi301072w
- 351. Campbell AC, Stiers KM, Martin Del Campo JS, Mehra-Chaudhary R, Sobrado P, Tanner JJ. Trapping conformational states of a flavin-dependent *N*-monooxygenase *in crystallo* reveals protein and flavin dynamics. J Biol Chem. 2020. doi:10.1074/jbc.RA120.014750
- 352. Leal SM, Roy S, Vareechon C, Carrion S deJesus, Clark H, Lopez-Berges MS, et al. Targeting iron acquisition blocks infection with the fungal pathogens *Aspergillus fumigatus* and *Fusarium oxysporum*. PLoS Pathog. 2013;9: e1003436. doi:10.1371/journal.ppat.1003436
- 353. Hsiang T, Baillie DL. Comparison of the yeast proteome to other fungal genomes to find core fungal genes. J Mol Evol. 2005;60: 475–483. doi:10.1007/s00239-004-0218-1
- 354. Miller MJ, Zhu H, Xu Y, Wu C, Walz AJ, Vergne A, et al. Utilization of microbial iron assimilation processes for the development of new antibiotics and inspiration for the design of new anticancer agents. Biometals. 2009;22: 61–75. doi:10.1007/s10534-008-9185-0
- 355. Dietl A-M, Misslinger M, Aguiar MM, Ivashov V, Teis D, Pfister J, et al. The siderophore transporter Sit1 determines susceptibility to the antifungal VL-2397. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63. doi:10.1128/AAC.00807-19
- 356. Nakamura I, Ohsumi K, Takeda S, Katsumata K, Matsumoto S, Akamatsu S, et al. ASP2397 is a novel natural compound that exhibits rapid and potent fungicidal activity against *Aspergillus* species through a specific transporter. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63. doi:10.1128/AAC.02689-18
- 357. Gilgado F, Cano J, Gené J, Guarro J. Molecular phylogeny of the *Pseudallescheria boydii* species complex: proposal of two new species. J Clin Microbiol. 2005;43: 4930–4942. doi:10.1128/JCM.43.10.4930-4942.2005
- 358. Gilgado F, Serena C, Cano J, Gené J, Guarro J. Antifungal susceptibilities of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Antimicrob Agents Chemother. 2006;50: 4211–4213. doi:10.1128/AAC.00981-06
- 359. Gilgado F, Cano J, Gené J, Serena C, Guarro J. Different virulence of the species of the *Pseudallescheria boydii* complex. Med Mycol. 2009;47: 371–374. doi:10.1080/13693780802256539
- 360. Lackner M, de Hoog GS, Verweij PE, Najafzadeh MJ, Curfs-Breuker I, Klaassen CH, et al. Species-specific antifungal susceptibility patterns of *Scedosporium* and *Pseudallescheria* species. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56: 2635–2642. doi:10.1128/AAC.05910-11
- 361. Lackner M, Hagen F, Meis JF, Gerrits van den Ende AHG, Vu D, Robert V, et al. Susceptibility and diversity in the therapy-refractory genus *Scedosporium*. Antimicrob Agents Chemother. 2014;58: 5877–5885. doi:10.1128/AAC.03211-14

- 362. Harun A, Serena C, Gilgado F, Chen SC-A, Meyer W. Scedosporium aurantiacum is as virulent as S. prolificans, and shows strain-specific virulence differences, in a mouse model. Med Mycol. 2010;48 Suppl 1: S45-51. doi:10.3109/13693786.2010.517224
- 363. Le Govic Y, Papon N, Le Gal S, Lelièvre B, Bouchara J-P, Vandeputte P. Genomic organization and expression of iron metabolism genes in the emerging pathogenic mold *Scedosporium apiospermum*. Front Microbiol. 2018;9: 827. doi:10.3389/fmicb.2018.00827
- 364. Courty PE, Hoegger PJ, Kilaru S, Kohler A, Buée M, Garbaye J, et al. Phylogenetic analysis, genomic organization, and expression analysis of multi-copper oxidases in the ectomycorrhizal basidiomycete *Laccaria bicolor*. New Phytol. 2009;182: 736–750. doi:10.1111/j.1469-8137.2009.02774.x
- 365. Hoegger PJ, Kilaru S, James TY, Thacker JR, Kües U. Phylogenetic comparison and classification of laccase and related multicopper oxidase protein sequences. FEBS J. 2006;273: 2308–2326. doi:10.1111/j.1742-4658.2006.05247.x
- 366. Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. A chiral high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for the stereospecific analysis of enoyl-coenzyme A hydratases/isomerases. J Chromatogr A. 2013;1306: 37–43. doi:10.1016/j.chroma.2013.07.049
- 367. Furukawa T, Scheven MT, Misslinger M, Zhao C, Hoefgen S, Gsaller F, et al. The fungal CCAAT-binding complex and HapX display highly variable but evolutionary conserved synergetic promoter-specific DNA recognition. Nucleic Acids Res. 2020;48: 3567–3590. doi:10.1093/nar/gkaa109
- 368. Le Govic Y, Papon N, Le Gal S, Bouchara J-P, Vandeputte P. Non-ribosomal peptide synthetase gene clusters in the human pathogenic fungus *Scedosporium apiospermum*. Front Microbiol. 2019;10: 2062. doi:10.3389/fmicb.2019.02062
- 369. Saikia S, Oliveira D, Hu G, Kronstad J. Role of ferric reductases in iron acquisition and virulence in the fungal pathogen *Cryptococcus neoformans*. Infection and Immunity. 2014;82: 839–850. doi:10.1128/IAI.01357-13
- 370. Urbanowski JL, Piper RC. The iron transporter Fth1p forms a complex with the Fet5 iron oxidase and resides on the vacuolar membrane. J Biol Chem. 1999;274: 38061–38070. doi:10.1074/jbc.274.53.38061
- 371. Li L, Chen OS, McVey Ward D, Kaplan J. CCC1 is a transporter that mediates vacuolar iron storage in yeast. J Biol Chem. 2001;276: 29515–29519. doi:10.1074/jbc.M103944200
- 372. Gardiner DM, Waring P, Howlett BJ. The epipolythiodioxopiperazine (ETP) class of fungal toxins: distribution, mode of action, functions and biosynthesis. Microbiology. 2005;151: 1021–1032. doi:10.1099/mic.0.27847-0
- 373. Fox EM, Howlett BJ. Biosynthetic gene clusters for epipolythiodioxopiperazines in filamentous fungi. Mycol Res. 2008;112: 162–169. doi:10.1016/j.mycres.2007.08.017
- 374. Dagenais TRT, Keller NP. Pathogenesis of *Aspergillus fumigatus* in invasive aspergillosis. Clin Microbiol Rev. 2009;22: 447–465. doi:10.1128/CMR.00055-08
- 375. Gayathri L, Akbarsha MA, Ruckmani K. In vitro study on aspects of molecular mechanisms underlying invasive aspergillosis caused by gliotoxin and fumagillin, alone and in combination. Sci Rep. 2020;10: 14473. doi:10.1038/s41598-020-71367-2
- 376. Chotirmall SH, Mirkovic B, Lavelle GM, McElvaney NG. Immunoevasive *Aspergillus* virulence factors. Mycopathologia. 2014;178: 363–370. doi:10.1007/s11046-014-9768-y
- 377. Wu Q, Jiang N, Bo Han W, Ning Mei Y, Ming Ge H, Kai Guo Z, et al. Antibacterial epipolythiodioxopiperazine and unprecedented sesquiterpene from *Pseudallescheria boydii*, a beetle (coleoptera)-associated fungus. Org Biomol Chem. 2014;12: 9405–9412. doi:10.1039/c4ob01494d

- 378. Li X, Kim S-K, Nam KW, Kang JS, Choi HD, Son BW. A new antibacterial dioxopiperazine alkaloid related to gliotoxin from a marine isolate of the fungus *Pseudallescheria*. J Antibiot. 2006;59: 248–250. doi:10.1038/ja.2006.35
- 379. Pavlaskova K, Nedved J, Kuzma M, Zabka M, Sulc M, Sklenar J, et al. Characterization of pseudacyclins A-E, a suite of cyclic peptides produced by *Pseudallescheria boydii*. J Nat Prod. 2010;73: 1027–1032. doi:10.1021/np900472c
- 380. Shrivastav M, De Haro LP, Nickoloff JA. Regulation of DNA double-strand break repair pathway choice. Cell Res. 2008;18: 134–147. doi:10.1038/cr.2007.111
- 381. Kanaar R, Hoeijmakers JH, van Gent DC. Molecular mechanisms of DNA double strand break repair. Trends Cell Biol. 1998;8: 483–489. doi:10.1016/s0962-8924(98)01383-x
- 382. Van Dyck E, Stasiak AZ, Stasiak A, West SC. Binding of double-strand breaks in DNA by human Rad52 protein. Nature. 1999;398: 728–731. doi:10.1038/19560
- 383. Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F, Cullin C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleic Acids Res. 1993;21: 3329–3330. doi:10.1093/nar/21.14.3329
- 384. Pastink A, Eeken JC, Lohman PH. Genomic integrity and the repair of double-strand DNA breaks. Mutat Res. 2001;480-481: 37-50. doi:10.1016/s0027-5107(01)00167-1
- 385. Weld RJ, Plummer KM, Carpenter MA, Ridgway HJ. Approaches to functional genomics in filamentous fungi. Cell Res. 2006;16: 31–44. doi:10.1038/sj.cr.7310006
- 386. Carvalho NDSP, Arentshorst M, Jin Kwon M, Meyer V, Ram AFJ. Expanding the ku70 toolbox for filamentous fungi: establishment of complementation vectors and recipient strains for advanced gene analyses. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;87: 1463–1473. doi:10.1007/s00253-010-2588-1
- 387. Ninomiya Y, Suzuki K, Ishii C, Inoue H. Highly efficient gene replacements in *Neurospora* strains deficient for nonhomologous end-joining. Proc Natl Acad Sci USA. 2004;101: 12248–12253. doi:10.1073/pnas.0402780101
- 388. Takahashi T, Masuda T, Koyama Y. Enhanced gene targeting frequency in *ku70* and *ku80* disruption mutants of *Aspergillus sojae* and *Aspergillus oryzae*. Mol Genet Genomics. 2006;275: 460–470. doi:10.1007/s00438-006-0104-1
- 389. Chang P-K. A highly efficient gene-targeting system for *Aspergillus parasiticus*. Lett Appl Microbiol. 2008;46: 587–592. doi:10.1111/j.1472-765X.2008.02345.x
- 390. Meyer V, Arentshorst M, El-Ghezal A, Drews A-C, Kooistra R, van den Hondel CAMJJ, et al. Highly efficient gene targeting in the *Aspergillus niger kusA* mutant. J Biotechnol. 2007;128: 770–775. doi:10.1016/j.jbiotec.2006.12.021
- 391. Zhang J, Mao Z, Xue W, Li Y, Tang G, Wang A, et al. Ku80 gene is related to non-homologous end-joining and genome stability in Aspergillus niger. Curr Microbiol. 2011;62: 1342–1346. doi:10.1007/s00284-010-9853-5
- 392. Choquer M, Robin G, Le Pêcheur P, Giraud C, Levis C, Viaud M. Ku70 or Ku80 deficiencies in the fungus Botrytis cinerea facilitate targeting of genes that are hard to knock out in a wild-type context. FEMS Microbiol Lett. 2008;289: 225–232. doi:10.1111/j.1574-6968.2008.01388.x
- 393. Snoek ISI, van der Krogt ZA, Touw H, Kerkman R, Pronk JT, Bovenberg R a. L, et al. Construction of an *hdfA Penicillium chrysogenum* strain impaired in non-homologous end-joining and analysis of its potential for functional analysis studies. Fungal Genet Biol. 2009;46: 418–426. doi:10.1016/j.fgb.2009.02.008

- 394. Hoff B, Kamerewerd J, Sigl C, Zadra I, Kück U. Homologous recombination in the antibiotic producer Penicillium chrysogenum: strain DeltaPcku70 shows up-regulation of genes from the HOG pathway. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;85: 1081–1094. doi:10.1007/s00253-009-2168-4
- 395. Li Z-H, Du C-M, Zhong Y-H, Wang T-H. Development of a highly efficient gene targeting system allowing rapid genetic manipulations in *Penicillium decumbens*. Appl Microbiol Biotechnol. 2010;87: 1065–1076. doi:10.1007/s00253-010-2566-7
- 396. Gandía M, Xu S, Font C, Marcos JF. Disruption of *ku70* involved in non-homologous end-joining facilitates homologous recombination but increases temperature sensitivity in the phytopathogenic fungus *Penicillium digitatum*. Fungal Biol. 2016;120: 317–323. doi:10.1016/j.funbio.2015.11.001
- 397. Ushimaru T, Terada H, Tsuboi K, Kogou Y, Sakaguchi A, Tsuji G, et al. Development of an efficient gene targeting system in *Colletotrichum higginsianum* using a non-homologous end-joining mutant and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated gene transfer. Mol Genet Genomics. 2010;284: 357–371. doi:10.1007/s00438-010-0572-1
- 398. Qi X, Su X, Guo H, Qi J, Cheng H. A *ku70* null mutant improves gene targeting frequency in the fungal pathogen *Verticillium dahliae*. World J Microbiol Biotechnol. 2015;31: 1889–1897. doi:10.1007/s11274-015-1907-1
- 399. Le Govic Y, Havlíček V, Capilla J, Luptáková D, Dumas D, Papon N, et al. Synthesis of the hydroxamate siderophore Na-methylcoprogen B in *Scedosporium apiospermum* is mediated by *sidD* ortholog and is required for virulence. Front Cell Infect Microbiol. 2020;10. doi:10.3389/fcimb.2020.587909
- 400. Chum PY, Schmidt G, Saloheimo M, Landowski CP. Transient silencing of DNA repair genes improves targeted gene integration in the filamentous fungus *Trichoderma reesei*. Appl Environ Microbiol. 2017;83. doi:10.1128/AEM.00535-17
- 401. Antelo L, Hof C, Welzel K, Eisfeld K, Sterner O, Anke H. Siderophores produced by *Magnaporthe grisea* in the presence and absence of iron. Z Naturforsch, C, J Biosci. 2006;61: 461–464. doi:10.1515/znc-2006-5-626
- 402. Howard DH, Rafie R, Tiwari A, Faull KF. Hydroxamate siderophores of *Histoplasma capsulatum*. Infect Immun. 2000;68: 2338–2343. doi:10.1128/iai.68.4.2338-2343.2000
- 403. Gsaller F, Blatzer M, Abt B, Schrettl M, Lindner H, Haas H. The first promoter for conditional gene expression in *Acremonium chrysogenum*: iron starvation-inducible mir1(P). Journal of Biotechnology. 2013;163: 77–80. doi:10.1016/j.jbiotec.2012.10.008
- 404. Jalal MA, Love SK, van der Helm D. N alpha-dimethylcoprogens. Three novel trihydroxamate siderophores from pathogenic fungi. Biol Met. 1988;1: 4–8. doi:10.1007/BF01128011
- 405. Liu M, Lin L, Gebremariam T, Luo G, Skory CD, French SW, et al. Fob1 and Fob2 Proteins are virulence determinants of *Rhizopus oryzae* via facilitating iron uptake from ferrioxamine. PLoS Pathog. 2015;11: e1004842. doi:10.1371/journal.ppat.1004842
- 406. Petrik M, Haas H, Schrettl M, Helbok A, Blatzer M, Decristoforo C. In vitro and in vivo evaluation of selected
 ⁶⁸Ga-siderophores for infection imaging. Nucl Med Biol. 2012;39: 361–369. doi:10.1016/j.nucmedbio.2011.09.012
- 407. Kaur J, Pethani BP, Kumar S, Kim M, Sunna A, Kautto L, et al. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Scedosporium aurantiacum*, an opportunistic fungal pathogen isolated from the lungs of cystic fibrosis patients. Front Microbiol. 2015;6: 866. doi:10.3389/fmicb.2015.00866
- 408. Homa M, Sándor A, Tóth E, Szebenyi C, Nagy G, Vágvölgyi C, et al. In vitro interactions of *Pseudomonas aeruginosa* with *Scedosporium* species frequently associated with cystic fibrosis. Front Microbiol. 2019;10: 441. doi:10.3389/fmicb.2019.00441

- 409. Chen SC-A, Patel S, Meyer W, Chapman B, Yu H, Byth K, et al. *Pseudomonas aeruginosa* inhibits the growth of *Scedosporium* and *Lomentospora* in vitro. Mycopathologia. 2018;183: 251–261. doi:10.1007/s11046-017-0140-x
- 410. Sass G, Ansari SR, Dietl A-M, Déziel E, Haas H, Stevens DA. Intermicrobial interaction: *Aspergillus fumigatus* siderophores protect against competition by *Pseudomonas aeruginosa*. PLoS One. 2019;14: e0216085. doi:10.1371/journal.pone.0216085
- 411. Sass G, Nazik H, Chatterjee P, Stevens DA. Under nonlimiting iron conditions pyocyanin is a major antifungal molecule, and differences between prototypic *Pseudomonas aeruginosa* strains. Med Mycol. 2020. doi:10.1093/mmy/myaa066
- 412. Reszka KJ, O'Malley Y, McCormick ML, Denning GM, Britigan BE. Oxidation of pyocyanin, a cytotoxic product from *Pseudomonas aeruginosa*, by microperoxidase 11 and hydrogen peroxide. Free Radic Biol Med. 2004;36: 1448–1459. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2004.03.011
- 413. Solé A, Salavert M. Fungal infections after lung transplantation. Curr Opin Pulm Med. 2009;15: 243–253. doi:10.1097/MCP.0b013e328326f410
- 414. 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. doi:10.1086/426445
- 415. Lamoth F, Kontoyiannis DP. Therapeutic challenges of non-*Aspergillus* invasive mold infections in immunosuppressed patients. Antimicrob Agents Chemother. 2019;63. doi:10.1128/AAC.01244-19
- 416. Álvarez-Uría A, Guinea JV, Escribano P, Gómez-Castellá J, Valerio M, Galar A, et al. Invasive *Scedosporium* and *Lomentospora* infections in the era of antifungal prophylaxis: A 20-year experience from a single centre in Spain. Mycoses. 2020. doi:10.1111/myc.13154
- 417. Shoham S. Emerging fungal infections in solid organ transplant recipients. Infect Dis Clin North Am. 2013;27: 305–316. doi:10.1016/j.idc.2013.02.004
- 418. Parize P, Boussaud V, Poinsignon V, Sitterlé E, Botterel F, Lefeuvre S, et al. Clinical outcome of cystic fibrosis patients colonized by *Scedosporium* species following lung transplantation: A single-center 15-year experience. Transpl Infect Dis. 2017;19. doi:10.1111/tid.12738

LE GOVIC Yohann Métabolisme du fer chez Scedosporium apiospermum, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je soussigné LE GOVIC Yohann

déclare être pleinement conscient 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 le 07/10/2020



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

DOCTORAT BIOLOGIE BRETAGNE SANTE LOIRE



Titre : Métabolisme du fer chez *Scedosporium apiospermum*, un pathogène fongique émergent dans la mucoviscidose.

Mots clés : Scedosporium, mucoviscidose, fer, sidérophores, synthèse peptidique non-ribosomique

Résumé : La physiopathologie des infections déterminées par les Scedosporium est encore mal connue. Cependant, l'aptitude de ces champignons à accéder aux ressources en fer constitue vraisemblablement un facteur clé de leur virulence, le fer étant impliqué dans de nombreux processus biologiques essentiels. Le premier objectif de cette thèse était donc d'identifier, par une analyse in silico, les gènes potentiellement impliqués dans le métabolisme du fer chez S. apiospermum, en particulier dans l'acquisition du fer médiée par les sidérophores. La biosynthèse de ces petites molécules chélatrices intervenir fait du fer des mégaenzymes appelées NRPSs (non-ribosomal peptide synthetases). Etant donné l'importance des NRPSs dans le métabolisme secondaire fongique, nous avons ensuite étendu l'analyse bioinformatique à l'ensemble des clusters de gènes comportant une NRPS, révélant ainsi le potentiel de synthèse des peptides nonribosomiques chez S. apiospermum.

Par ailleurs, des mutants défectifs pour le gène codant la NRPS chargée d'orchestrer la production d'un sidérophore extracellulaire ont été générés. L'étude de ces mutants a permis d'identifier la structure exacte du sidérophore produit, et de démontrer son importance pour la croissance et la virulence du champignon. Nos expériences ont également dévoilé la capacité de ce sidérophore à pirater le fer lié à d'autres sidérophores comme la pyoverdine, pourrait expliquer l'antagonisme ce qui rapporté entre les Scedosporium et le bacille pyocyanique dans le contexte de mucoviscidose. Au total, ces résultats indiquent un rôle majeur du système sidérophore chez Scedosporium, qui pourrait donc constituer nouvelle une cible thérapeutique pour ces champignons très peu sensibles aux antifongiques actuels.

Title: Iron metabolism in Scedosporium apiospermum, an emerging fungal pathogen in cystic fibrosis

Keywords: Scedosporium, cystic fibrosis, iron, siderophores, nonribosomal peptide synthesis

Abstract: The pathogenesis of infections caused by Scedosporium species is still poorly understood. However, the ability of these fungi to compete with iron is likely a key factor of their virulence, as iron is involved in many essential processes. Therefore, biological the first objective of this thesis was to identify, by an in silico analysis, the genes putatively involved iron metabolism in S. apiospermum, in especially those involved in siderophoremediated iron uptake. The biosynthesis of these chelating molecules iron involves small megaenzymes called NRPSs (non-ribosomal peptide synthetases). Given the importance of NRPSs in fungal secondary metabolism, we then extended the bioinformatic analysis to all gene clusters containing an NRPS gene, which revealed the diversity of non-ribosomal peptides synthetized by S. apiospermum.

In addition, mutants defective for the NRPS gene responsible for the production of an extracellular siderophore were generated. The study of these mutants enabled us to determine the structure of the siderophore produced, and to demonstrate its importance for growth and virulence of the fungus. Our experiments also revealed the ability of this siderophore to scavenge iron bound to other siderophores such as pyoverdin, which might explain the reported antagonism between Scedosporium and Pseudomonas aeruginosa in the context of cystic fibrosis. Altogether, these results indicate a major role for the siderophore system in Scedosporium, which could therefore constitute a new therapeutic target for drug development against these therapy-refractory pathogens.